

RODRIGO ARANTES REIS

**ESTUDO FILOGENÉTICO DE FOTOBIONTES DE LIQUENS;
ISOLAMENTO E CULTIVO DE SIMBIONTES LIQUÊNICOS;
ESTUDO COMPARATIVO DE POLISSACARÍDEOS E ÁCIDOS GRAXOS DO
LÍQUEN *TELOSCHISTES FLAVICANS* E SEUS SIMBIONTES**

Tese de Doutorado apresentada ao Curso de Pós-Graduação em Ciências (Bioquímica) da Universidade Federal do Paraná como requisito parcial para a obtenção do título de Doutor em Ciências – Bioquímica.

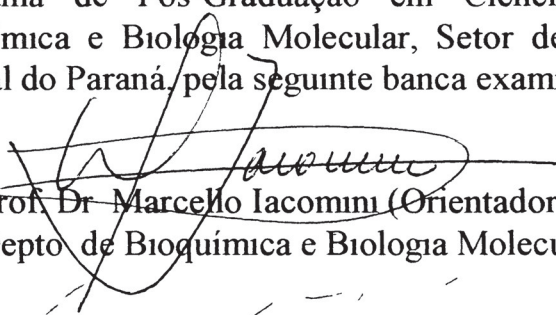
**CURITIBA
2005**

TERMO DE APROVAÇÃO

RODRIGO ARAÚJO DE REIS

**ESTUDO FILOGENÉTICO DE FOTOBIONTES DE LÍQUENS;
ISOLAMENTO E CULTIVO DE SIMBIONTES LIQUÊNICOS; ESTUDO
COMPARATIVO DE POLISSACARÍDEOS E ÁCIDOS GRAXOS DO
LÍQUEN *Teloschistes flavicans* E SEUS SIMBIONTES**

Tese aprovada como requisito parcial para a obtenção do grau de Doutor no Programa de Pós-Graduação em Ciências – Bioquímica, Departamento de Bioquímica e Biologia Molecular, Setor de Ciências Biológicas da Universidade Federal do Paraná, pela seguinte banca examinadora.




Prof. Dr. Marcelo Iacomini (Orientador),
Depto. de Bioquímica e Biologia Molecular - UFPR

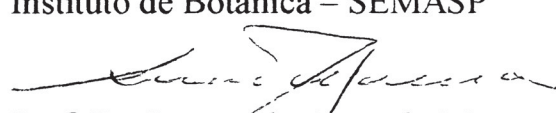
Prof. Dr. Leonardo Magalhães Cruz
Depto. de Bioquímica e Biologia Molecular - UFPR



Prof. Dr. Marcos Silveira Buckeridge
Instituto de Botânica – SEMASP



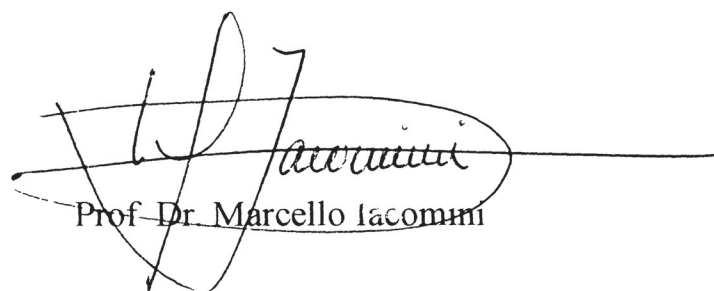
Prof. Dr. Marcelo Marcelli
Instituto de Botânica – SEMASP



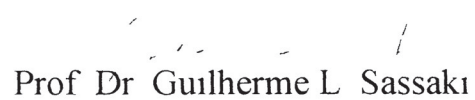
Prof. Dr. Renato de Azevedo Moreira
Departamento de Bioquímica - UFCE

Curitiba, 28 de abril de 2005

Orientação



Prof. Dr. Marcello Iacomini



Prof. Dr. Guilherme L. Sasaki

PROF. DR. MARCELLO IACOMINI
ORIENTADOR

PROF. DR. GUILHERME LANZI SASSAKI
CO-ORIENTADOR

A simbiose é atualmente amplamente aceita como uma fonte de inovação evolucionária (Margulis & Fester).

Agradecimentos

Durante os quatro anos de execução deste trabalho várias pessoas foram importantes para o seu sucesso, desta maneira, gostaria de agradecer-las aqui, por toda ajuda recebida, seja pessoal, profissional, logística e/ou intelectual.

Em um primeiro momento gostaria de agradecer a pessoas que são a razão de minha existência e que, seja de perto ou de longe, sei que estão sempre torcendo por mim. Aos meus pais, Goreti e Rogério, gostaria de dizer que esta conquista também é de vocês. Peço que nunca desistam, pois, como dizia o poeta: “Tudo vai dar certo”.

À Juliana, minha eterna companheira, meu amor, meu suporte, minha inspiração. Muito obrigado por sempre estar presente, mesmo quando distante. Não sei se teria conseguido sem você. Minha felicidade é saber que a nossa vida começa agora.

Ao meu orientador, Prof. Marcello Iacomini, por sempre ter confiado na minha capacidade e no meu trabalho e por sempre ter me dado a liberdade de escolher qual caminho seguir. Se hoje tenho essa formação abrangente a responsabilidade também é sua. Sempre terei orgulho de dizer que fui seu aluno.

Ao Guilherme, mais que um orientador, um grande amigo. Muito obrigado por “suportar” esse seu aluno-amigo. Tenho certeza que você será também um grande pesquisador, pois uma grande pessoa você já é! Keep Walking!!

Ao Prof. Dr. Martin Grube, que me recebeu em seu laboratório na Áustria. Não consigo imaginar como poderia ter sido melhor recebido. Além disto, muito obrigado por transformar o antes misterioso mundo dos líquidos (pelo menos para mim) em algo surpreendente e motivador.

Ao Professor Gorin, pelo simples fato de estar presente no laboratório e sempre compartilhar seu infinito conhecimento. O cientista que eu gostaria de ser.

Aos grandes amigos do Laboratório, Lauro e Vassoler. Obrigado pela força quando estava longe, pelas inúmeras conversas e conselhos. Pessoas como vocês fazem o dia-a-dia no laboratório mais fácil.

Não poderiam faltar meus colegas de sala Ricardo e Fernanda, tenho a certeza de que nunca vou achar um ambiente melhor para se trabalhar do que aquele existente na sala 252.

Às pessoas que tiveram participação ativa neste trabalho, Dirce e Andréa, muito obrigado. Se consegui lhes passar ao menos um pouco do meu entusiasmo pela pesquisa, já me considero feliz.

A todos colegas de laboratório, Ana Helena, Elaine, Fhernanda, Roger, Maria Luiza, enfim todos que fazem parte desta família que em que vivemos. Mas aqui gostaria de fazer um agradecimento especial a três pessoas: meus amigos Barão e Baronesa (Thales e Carol), e aqui tenho que agradecer a tudo..... conversas, conselhos, opiniões, idéias; e Lucimara, por toda força que me deu na viagem a Áustria e pela bela colaboração que já rendeu diversos frutos.

A todos os colegas do departamento, incluindo Adriano, Stefan, Carol, Alan, Paula, Diogo, Marcelinho, Fumaça.

Aos meus colegas que deixei na Áustria: Julia, Elizabeth, Bárbara, Sabine, Walter, Prof. Mayerhofer, Stephan, Tony, Hansi, muito obrigado por terem facilitado esses seis meses longe de casa. Saudades...

Às liquenólogas, Sionara Eliasaro e Cristine Donha, muito obrigado por todo apoio nas coletas, identificações e principalmente na maneira como trabalharam no problema com a SPVS.

A todos os professores do grupo de Química de Carboidratos, em especial aos professores Miguel, Fanny e Maria Eugênia.

Ao Laboratório de Fixação de Nitrogênio, em especial aos professores: Fábio, pelo acesso ao laboratório e apoio providencial em um momento decisivo do meu doutorado; Emanuel, por sempre estar disposto a me ouvir e apresentar opiniões que ajudaram na solução de problemas; Leonardo, um amigo com o qual espero trabalhar muito ainda.

Aos companheiros do Departamento de Bióloga Celular: Marco, Zão, Célia, Ruth, Dorly, muito obrigado pelo acesso e ensinamentos na área.

Às agências que financiaram este trabalho, CAPES, CNPq, Fundação Araucária. Também as instituições que possibilitaram as coletas e transporte das amostras, Fundação Boticário, Ministério do Meio Ambiente, IAP, IBAMA, SPVS.

Retornado ao lado pessoal, gostaria de agradecer a meus irmãos, Rafael e Renata e diversos familiares Pedrinho, Cássia, Fernando, Gracy, Ondina, Helena, Thiago, Vitor, Lucas, Matheus, Leonardo, Fernanda, Cíntia, Ferrari, Marly, Rita, Regina, Bárbara. Obrigado por serem o porto seguro a quem sempre pude recorrer. Sei que sempre torceram por mim.

Ao meu grande amigo Paulista.... Embora tenha tentado por várias vezes, acho que nunca conseguirei agradecer o companheirismo e amizade. Que você e a Michele sejam muito felizes. Tenho certeza que, independente dos caminhos que iremos traçar daqui pra frente sempre seremos amigos.... um grande abraço!!!

À outros grandes amigos, Carlão, Rafa, Ingo, Elaine, Cassiana, Fafã, Renato, peço desculpas por estar distante, porém tenham certeza que fazem parte da minha história.

Gostaria de agradecer, e muito aos liquens.... a todos eles, por serem tão fascinantes e misteriosos. Enfim gostaria de agradecer a quem torna isso tudo possível, independente da denominação: Deus, Mãe Natureza, Gaia.....

.....Muito obrigado

Rodrigo Arantes Reis

Abril – 2005.

Sumário

<i>Orientação</i>	i
<i>Agradecimentos</i>	iii
<i>Sumário</i>	vi
<i>Lista de tabelas</i>	x
<i>Lista de Figuras</i>	xi
<i>Resumo</i>	xiv
<i>Abstract</i>	xv
<i>Introdução</i>	01
<i>Capítulo 1: Fotobiontes de fungos liquenizados</i>	06
1.1 <i>Introdução</i>	06
1.2. <i>Objetivos</i>	17
1.2.1. <i>Objetivo geral</i>	17
1.2.2. <i>Objetivos específicos</i>	17
1.3. <i>Material e métodos</i>	18
1.3.1. <i>Material</i>	18
1.3.2. <i>Extração de DNA, PCR e seqüenciamento</i>	21
1.3.3. <i>Análise dos Dados</i>	27
1.4. <i>Resultados e discussão</i>	29
1.4.1. <i>Asterochloris</i>	29
1.4.2. <i>Trebouxia</i>	34
1.5. <i>Conclusões</i>	49
<i>Capítulo 2: Cultivo de simbiontes liquênicos</i>	50
2.1. <i>Introdução</i>	50
2.2. <i>Objetivos</i>	56
2.2.1. <i>Objetivo geral</i>	56
2.2.2. <i>Objetivos específicos</i>	56
2.3. <i>Materiais e métodos</i>	57
2.3.1 <i>Liquens</i>	57
2.3.2. <i>Isolamento e cultivo dos micobiontes</i>	58
2.3.3. <i>Isolamento e cultivo dos Fotobiontes</i>	59
2.3.4. <i>Meios de Cultura</i>	62
2.4. <i>Resultados e discussão</i>	62

2.4.1.	<i>Isolamento dos simbiontes de <u>T. flavicans</u></i>	62
2.4.1.1.	<i>Micobionte</i>	63
2.4.1.2.	<i>Fotobionte</i>	65
2.4.2.	<i>Isolamento e cultivo de simbiontes liquênicos</i>	69
2.5.	<i>Conclusões</i>	79
	<i>Capítulo 3: Análise de ácidos graxos do líquen <u>Teloschistes flavicans</u> e seus biontes isolados</i>	80
3.1.	<i>Introdução</i>	81
3.2.	<i>Objetivos</i>	83
3.2.1.	<i>Objetivo geral</i>	83
3.2.2.	<i>Objetivos específicos</i>	83
3.3.	<i>Materiais e Método</i>	84
3.3.1.	<i>Coleta e manipulação do material liquênico</i>	84
3.3.2.	<i>Isolamento do micobionte e fotobionte</i>	84
3.3.2.1.	<i>Condição de cultivo do micobionte e fotobionte</i>	84
3.3.2.2.	<i>Fotobionte</i>	84
3.3.2.3.	<i>Micobionte</i>	85
3.3.3.	<i>Análise comparativa dos ácidos graxos em diferentes condições de cultivo</i>	85
3.3.4.	<i>Extração e análise de ácidos graxos</i>	85
3.4.	<i>Resultados e Discussão</i>	87
3.4.2.	<i>Composição de ácidos graxos em micobiontes submetidos a diferentes condições de crescimento</i>	92
3.5.	<i>Conclusões</i>	98
	<i>Capítulo 4: Polissacarídeos dos simbiontes de <u>Teloschistes flavicans</u></i>	99
4.1.	<i>Introdução</i>	99
4.1.1.	<i>Polissacarídeos de líquens</i>	99
4.1.2.	<i>Polissacarídeos de <u>T. flavicans</u></i>	102
4.1.3.	<i>Polissacarídeos de Simbiontes Liquênicos</i>	103
4.2.	<i>Objetivo</i>	108
4.2.1.	<i>Objetivo geral</i>	108
4.2.2.	<i>Objetivos específicos</i>	108
4.3.	<i>Material e métodos</i>	109
4.3.1.	<i>Material de estudo</i>	109
4.3.2.	<i>Isolamento dos polissacarídeos do micobionte de <u>T. flavicans</u></i>	109
4.3.2.1.	<i>Extração Acetona</i>	109
4.3.2.2.	<i>Extração dos polissacarídeos</i>	109
4.3.2.3.	<i>Purificação dos polissacarídeos</i>	110

4.3.2.4.	<i>Separação dos polissacarídeos por congelamento e degelo</i>	110
4.3.3.	<i>Isolamento dos polissacarídeos do fotobionte de <u>T. flavicans</u></i>	111
4.3.3.1.	<i>Isolamento dos polissacarídeos</i>	111
4.3.3.2.	<i>Deslipidificação</i>	111
4.3.3.3.	<i>Extração de carboidratos de baixa massa molecular e alditóis</i>	111
4.3.3.4.	<i>Extração dos polissacarídeos</i>	112
4.3.3.4.	<i>Purificação dos polissacarídeos</i>	112
4.3.3.5.	<i>Separação dos polissacarídeos por congelamento e degelo</i>	112
4.3.3.6.	<i>Desproteínização através de precipitação com ácido tricloroacético (TCA)</i>	113
4.3.3.7.	<i>Filtração por membranas</i>	113
4.3.4.	<i>Análise estrutural dos polissacarídeos em estudo</i>	114
4.3.4.1.	<i>Determinação da composição em monossacarídeos</i>	114
4.3.4.2.	<i>Metilação dos polissacarídeos</i>	114
4.3.4.3.	<i>Métodos analíticos</i>	115
4.3.4.4.	<i>Métodos gerais</i>	116
4.4.	<i>Resultados e Discussão</i>	117
4.4.1.	<i>Isolamento dos polissacarídeos do micobionte de <u>T. flavicans</u></i>	117
4.4.2.	<i>Caracterização estrutural dos polissacarídeos do micobionte de <u>T. flavicans</u></i>	122
4.4.3.	<i>Isolamento e caracterização do polissacarídeo isolado do fotobionte de <u>T. flavicans</u></i>	129
4.5.	<i>Conclusão</i>	137
	<i>Considerações Finais</i>	138
	<i>5. Referências Bibliográficas</i>	141
	<i>6. Apêndices</i>	153
	<i>Apêndice 1: Artigo 1</i>	153
	<i>Apêndice 2: Artigo2</i>	183

Lista de Tabelas

	<i>Introdução</i>	
Tabela 1	Estratégia de obtenção de carbono fixado dos fungos	04
	<i>Capítulo 1: Fotobiontes de fungos liquenizados.</i>	
Tabela 1.1	Caracteres utilizados na separação entre <i>Trebouxia</i> e <i>Asterochloris</i> .	11
Tabela 1.2	Lista dos líquens analisados neste estudo	18
Tabela 1.3	Local, ecossistema e localização dos pontos de coleta	20
Tabela 1.4	<i>Primers</i> utilizados nas análises filogenéticas	22
Tabela 1.5	Sequências utilizadas nas análises filogenéticas	23
	<i>Capítulo 2: Cultivo de simbiontes liquenicos</i>	
Tabela 2.1	Líquens submetidos ao processo de isolamento de seus simbiontes	57
Tabela 2.2	Resultados do processo de isolamento de simbiontes de líquens	70
	<i>Capítulo 3: Análise de ácidos graxos do líquen <u>Teloschistes flavicans</u> e seus biontes isolados</i>	
Tabela 3.1	Ácidos graxos metil-ésteres (AGME) do micobionte, fotobionte e talo do líquen <i>Teloschistes flavicans</i>	90
Tabela 3.2	Composição e crescimento em diferentes meios de cultura	93
Tabela 3.3	Concentração de ácidos graxos do micobionte de <i>T. flavicans</i> em diferentes condições de cultivo	95
Tabela 3.4	Relação de saturação de ácidos graxos	96
	<i>Capítulo 4: Polissacarídeos dos simbiontes de T. flavicans</i>	
Tabela 4.1	Tipos de ligação presentes em glucanas de líquens	100
Tabela 4.2	Rendimento das frações MTF (micobionte de <i>T. flavicans</i>)	120
Tabela 4.3	Composição monossacarídica das frações obtidas de extrações e purificação das frações do micobionte de <i>T. flavicans</i>	120
Tabela 4.4	Análise por metilação da glucana isolada na fração TFMA-4	123
Tabela 4.5	Análise de metilação da glucana isolada na fração TFM-D2	128
Tabela 4.6	Rendimento das frações TTF (<i>Trebouxia</i> de <i>T. flavicans</i>)	130
Tabela 4.7	Composição monossacarídica das frações obtidas de extrações e purificação das frações do micobionte de <i>T. flavicans</i>	132

Lista de Figuras

<i>Capítulo 1: Fotobiontes de fungos liquenizados</i>		
Figura 1.1	Ultraestrutura dos pirenóides presentes nos fotobiontes do gênero <i>Trebouxia</i>	09
Figura 1.2	Localização das principais seqüências utilizadas em estudos filogenéticos	12
Figura 1.3	Filogenia do gênero <i>Trebouxia</i> proposta por Helms (2003)	14
Figura 1.4	Mapa de coleta	21
Figura 1.5	Localização dos Primers usados nas análises filogenéticas	22
Figura 1.6	Árvore consenso para o gênero <i>Asterochloris</i> obtida através de análise Bayesiana	30
Figura 1.7	Detalhe da Subclade IIa da árvore filogenética do gênero <i>Asterochloris</i>	32
Figura 1.8	Árvore consenso para o gênero <i>Trebouxia</i> obtida através de análise Bayesiana	35
Figura 1.9	Detalhe da Clade G, da árvore filogenética do gênero <i>Trebouxia</i>	36
Figura 1.10	Detalhe da Clade I, da árvore filogenética do gênero <i>Trebouxia</i>	40
Figura 1.11	Detalhe da Clade S, da árvore filogenética do gênero <i>Trebouxia</i>	42
Figura 1.12	Detalhe da Clade A, da árvore filogenética do gênero <i>Trebouxia</i>	43
Figura 1.13	Teoria da distribuição filogeográfica de fotobiontes do gênero <i>Trebouxia</i> baseada na presença de linhagens tropicais	45
Figura 1.14	Teoria da distribuição filogeográfica de fotobiontes do gênero <i>Trebouxia</i> baseada na deriva continental	46
<i>Capítulo 2: Cultivo de simbiontes liquênicos</i>		
Figura 2.1	Metodologia de isolamento de micobionte através de esporos	53
Figura 2.2	Metodologia de isolamento de micobionte através de fragmentos de talo	54
Figura 2.3	Líquen <i>Teloschistes flavicans</i>	63
Figura 2.4	Processo de isolamento do micobionte de <i>Teloschistes flavicans</i>	64
Figura 2.5	Desenho esquemático apresentando o ciclo de vida da alga <i>Trebouxia</i> em cultura	66
Figura 2.6	Estrutura dos fotobiontes <i>T. higginsiae</i> e <i>T. galapagensis</i>	68
Figura 2.7	Processo de isolamento do micobionte de <i>Physcia aipolia</i>	72
Figura 2.8	Processo de isolamento do micobionte de <i>Xanthoria parietina</i>	73
Figura 2.9	Colônias de micobiontes desenvolvidas	74
Figura 2.10	Culturas de fotobiontes isolados	76
Figura 2.11	Fotobionte <i>Asterochloris</i>	77
Figura 2.12	Fotobionte <i>Trebouxia</i>	78
<i>Capítulo 3: Análise de ácidos graxos do líquen <u>Teloschistes flavicans</u> e seus biontes isolados</i>		
Figura 3.1	Variação da composição de ácidos graxos de <i>Teloschistes flavicans</i> , seu micobionte, <i>Xanthoria parietina</i> , <i>Physcia stellaris</i> e <i>Physcia dubia</i>	91
<i>Capítulo 4: Polissacarídeos dos simbiontes de T. flavicans</i>		

Capítulo 3: Análise de ácidos graxos do líquen *Teloschistes flavicans* e seus biontes isolados

Figura 4.1	Espectros de ^{13}C -RMN de algumas glucanas de líquens	101
Figura 4.2	Espectro de RMN ^{13}C da pululana de <i>Teloschistes flavicans</i>	102
Figura 4.3	Espectro de RMN ^{13}C da β -D-glucana fração	103
Figura 4.4	Desenho esquemático de várias camadas e seus constituintes de parede celular de <i>Trebouxia</i> e <i>Pseudotreboxia</i>	107
Figura 4.5	Fluxograma de extração e purificação dos polissacarídeos do micobionte de <i>T. flavicans</i>	118
Figura 4.6	Espectro de RMN ^{13}C das frações TFM-A, TFM-A2 e TFM-A4 do processo de purificação dos polissacarídeos do micobionte de <i>T. flavicans</i>	121
Figura 4.7	Espectro de RMN ^{13}C da fração TFM-A4	124
Figura 4.8	Detalhe do espectro de RMN ^{13}C – DEPT da fração TFM-A4	124
Figura 4.9	Integração da região de H-1 do espectro de RMN ^1H da α -glucana isolada do micobionte do líquen <i>Teloschistes flavicans</i>	125
Figura 4.10	Diagrama mostrando a interação existente o líquen <i>Peltigera</i> , entre o micobionte e o fotobionte <i>Nostoc</i>	127
Figura 4.11	Espectro de RMN ^{13}C da fração TFM-D2, apresentando a β -glucana (1 \rightarrow 3) (1 \rightarrow 6)-ligada	128
Figura 4.12	Fluxograma de extração e purificação dos polissacarídeos do fotobionte de <i>T. flavicans</i>	131
Figura 4.13	Espectro de RMN ^{13}C das frações TTF-A, TTF-A1, TTF-A3 e TTF-5, demonstrando o processo de purificação da β -galctofuranana presente no fotobionte isolado de <i>T. flavicans</i> .	133
Figura 4.14	Espectro de RMN ^{13}C da fração TFM-D2, apresentando a β -galactofuranana (1 \rightarrow 5)-ligada	134

Resumo

O presente estudo foi dividido em quatro capítulos distintos. O primeiro corresponde ao estudo filogenético de fotobiontes de líquens coletados na região de Guaraqueçaba (litoral do Paraná). A segunda etapa corresponde a tentativa de isolamento e cultivo de simbiontes liquênicos, entre eles o foto e o micobionte do líquen *Teloschistes flavicans*. Estes simbiontes isolados foram utilizados nos capítulos três e quatro, no estudo comparativo de seus ácidos graxos e polissacarídeos respectivamente. O capítulo 1 originou como principais resultados a presença de linhagens de fotobiontes associados a regiões tropicais. Estas linhagens estão presentes tanto para os gêneros *Trebouxia* como *Asterochloris*. As tentativas de cultivo de simbiontes liquênicos apresentadas no capítulo dois demonstram um sucesso no isolamento dos micobiontes dos líquens *Xanthoria parietina*, *Cladonia ceratophylla*, *Cladonia* sp., *Ramalina peruviana* e *Siphula pteruloides*. Além destes, os fotobiontes dos líquens *Cladonia ceratophylla*, *Cladonia* sp., *Ramalina peruviana*, *Cladia aggregata*, *Ramalina celastri* foram isolados com sucesso. Finalmente o isolamento de ambos os simbiontes do líquen *Teloschistes flavicans* permitiu uma análise comparativa de alguns metabólitos primários, apresentados nos capítulos seguintes. O capítulo três trata da análise comparativa dos ácidos-graxos presentes no líquen *T. flavicans* em relação a seus simbiontes em cultivo. Os resultados obtidos demonstram que a composição de ácidos graxos do líquen não corresponde à soma da composição apresentada por seus simbiontes isolados, sugerindo que a interação presente na simbiose liquênica é importante no metabolismo de ácidos graxos. Além destes resultados, foi observado que a composição de ácidos graxos é influenciada pela temperatura, e conseqüentemente pela sazonalidade, tanto no micobionte como no líquen intacto, sendo observado um aumento do teor de ácidos graxos saturados em maiores temperaturas. No estudo relativo aos polissacarídeos dos simbiontes de *T. flavicans*, apresentado no quarto e último capítulo deste trabalho, foram isoladas e caracterizadas 3 moléculas. Do fotobionte foi isolado uma β -D-galactofuranana, com ligações do tipo (1 \rightarrow 5). Para o micobionte foram isoladas duas glucanas. A primeira, uma α -D-glucana com ligações alternadas do tipo (1 \rightarrow 4)(1 \rightarrow 6), na relação molar de 1:1, denominada pululana. A segunda molécula foi caracterizada como uma β -D-glucana com ligações do tipo (1 \rightarrow 3)(1 \rightarrow 6). Dos polissacarídeos caracterizados apenas as duas glucanas haviam sido observadas anteriormente para o líquen *T. flavicans*.

Abstract

The present study was developed in four parts. The first Chapter correspond to the phylogenetic study of lichens photobionts, which were collected in the Guaraqueçaba region (Coast of Paraná- Brazil). The second Chapter was to obtain axenic cultures of lichen symbionts, including the myco- and photobionts of the lichen *Teloschistes flavicans*. The isolated symbionts were used in Chapters three and four, in comparative studies of polysaccharides and fatty acids respectively. The results of Chapter one represent as the main aims, the presence of photobiont lineages associated whit tropical regions. These lineages are present in *Trebouxia* and *Asterochloris*. The isolation and cultivation presented in the Chapter two were successfully in the isolation of the mycobiont from the lichens *Xanthoria parietina*, *Cladonia ceratophylla*, *Cladonia* sp., *Ramalina peruviana* e *Siphula pteruloides*. Moreover, the photobionts of the lichens *Cladonia ceratophylla*, *Cladonia* sp., *Ramalina peruviana*, *Cladia aggregata*, *Ramalina celastri* were isolated. Finally, the isolation of both *T. flavicans* symbionts enable the possibility of a comparative analysis of some primary metabolites (fatty acids and polysaccharides), which are presented in the following Chapters. Chapter three concern a comparative analysis of the fatty acid present in the lichen *T. flavicans* with its cultured symbionts. The fatty acid composition present in the lichen do not correspond to the composition of both symbionts in culture, suggesting that the interaction present in the symbiotic association is important in fatty acid metabolism. Moreover it was observed that the fatty acid composition is influenced by temperature and consequently by seasonal aspects. This was observed in the mycobiont and the intact lichen, and shown an increase of saturated fatty acids in higher temperatures. In the Polysaccharide studies, presented in the fourth and last Chapter, three different polysaccharides were isolated and characterized. From the photobiont was isolated a (1→5)-linked β-D-galactofurannan. From the mycobiont were isolated two glucans, namely, pullulan, a (1→4)(1→6)-linked α-D-glucan, with a molar ratio of 1:1, and the second was characterized as a (1→3)(1→6)-linked β-D-glucan. Of the characterized polysaccharides, only the two glucans were previously known in the lichen *T. flavicans*.

Introdução

Líquens são associações simbióticas entre um fungo (micobionte) e um organismo fotossintetizante, o qual pode ser uma alga verde (ficobionte) e, ou uma cianobactéria (cianobionte) (AHMADJIAN, 1993; NASH III, 1996). O nome líquen (do grego lie'ken) foi atribuído por Teofrastus, o pai da Botânica, em referência às excrescências encontradas nos troncos de oliveiras (MARCELLI, 1995).

O talo da maioria dos fungos liquenizados consiste de um córtex e uma medula, ambos formados por pseudo-tecidos originados do fungo. Além disso, apresenta uma camada fotobionte, conhecida como camada algal, formada por células de algas ou cianobactérias envolvidas por hifas do micobionte. As células da camada algal, que correspondem em média a 7% do volume total do talo, estão arranjas de maneira a obter uma quantidade ótima de luz do sol para fotossíntese. As diferentes camadas e a forma como estão posicionadas no talo são resultados de diversas pressões adaptativas sofridas ao longo da evolução (AHMADJIAN, 1993).

A natureza dualística dos líquens foi primeiramente reportada por DEBARY (1866), que aplicou este conceito somente a líquens gelatinosos. Entretanto em 1869 o suíço SIMON SCHWENDENER generalizou este conceito para todos os líquens.

A Associação Internacional de Lichenólogos (IAL) define líquen como: “Associação de um fungo com um simbionte fotossintetizante resultando em um talo estável de estrutura específica”. Por outro lado, no Código de Nomenclatura Botânica, artigo 13.1d, destaca-se: “Para propósitos de nomenclatura, nomes dados aos líquens serão considerados como aplicados ao seu componente fúngico” (PURVIS, 2000).

Alguns autores oferecem definições alternativas de líquens, as quais são mais compatíveis com as regras de nomenclatura. HONEGGER (1991) define líquens como: “fenótipo simbiótico de fungos nutricionalmente especializados que vivem como um “biotrofo” (organismos que obtêm nutrientes de um hospedeiro vivo) ecologicamente obrigatório em simbiose com uma alga e/ou cianobactéria”. TREVOR GOWARD (citado por SHARNOFF & SHARNOFF, 2001) cita líquens como sendo “fungos que descobriram a agricultura”, principalmente devido ao fato de que o micobionte é incapaz de sintetizar seu próprio nutriente, e utiliza o fotobionte de maneira controlada para o fornecimento de

nutrientes para o seu desenvolvimento. Para TEHLER (1996), "Líquens não são organismos; líquens são pequenos ecossistemas, associações entre dois ou mais componentes".

A natureza da simbiose líquênica é um assunto amplamente debatido, sendo que a grande controvérsia é se esta se trata de um caso de mutualismo ou parasitismo. Alguns autores consideram a simbiose líquênica como um claro exemplo de mutualismo (onde ambos os parceiros são beneficiados com a associação). Isto se deve principalmente ao fato dos líquens serem encontrados em praticamente todo o planeta e suas algas apresentarem-se “saudáveis” no interior do talo (PURVIS, 2000). Outros acreditam que se trata de um parasitismo controlado (AHMADJIAN, 1993), destes SIMON SCHWENDENER, em 1867, escreveu:

“Como resultado das minhas pesquisas, líquens não são simples plantas, não são indivíduos comuns; eles são ao invés disto colônias, as quais são constituídas de centenas de milhares de indivíduos, dos quais um sozinho tem o papel de mestre, enquanto os outros, eternamente aprisionado, preparam os nutrientes para si próprio e para o seu mestre. Este fungo é um fungo da classe dos Ascomycetos, um parasita que está acostumado a viver do trabalho dos outros. Seus escravos são algas verdes, as quais ele aprisionou e obriga a trabalhar para si. Ele as aprisiona como uma aranha a sua presa, com uma teia fibrosa e fechada, o qual vai se transformando em uma impenetrável capa. Mas enquanto a aranha suga sua presa e a deixa morta, o fungo incita a alga aprisionada em sua teia a aumentar a sua atividade”. (SCHWENDENER, 1867; CITADO POR AHMADJIAN, 1993).

Na realidade, atualmente os especialistas concordam que o tipo de simbiose varia desde o parasitismo até o mutualismo estrito, dependendo de quais grupos taxonômicos de fungos e de algas (ou cianobactérias) estejam envolvidos. Em associações simbióticas desse tipo, o organismo que contém o outro pode ser chamado de “exhabitante” e o que vive em seu interior de “inhabitante” (HONEGGER, 1991; HELMS, 2003).

É fácil identificar a vantagem obtida pelo fungo com esta associação, a obtenção de carbono fixado pelo organismo fotossintetizante, na forma de poliol no caso de algas verdes, e de glucose no caso de cianobactérias. Deste último, o micobionte pode obter ainda

o nitrogênio fixado. Até o momento não se tem conhecimento de que o fungo passe algum nutriente para o fotobionte (AHMADJIAN, 1993; PURVIS, 2000). Entretanto, sabe-se que o micobionte modifica os parceiros com ele associados. Os fotobiontes podem perder a sua parede celular e também deixar de apresentar estruturas reprodutivas. Porém, ambos os parceiros dividem um benefício. Juntos eles têm a capacidade de colonizar ambientes que sozinhos não seriam capazes (PURVIS, 2000).

Os fungos, como organismos heterótrofos, desenvolveram uma série de estratégias para adquirir carbono fixado. Os fungos liquenizados, assim como os fungos patógenos de plantas ou fungos de micorrizas, são um grupo polifilético, de especialistas nutricionais. A liquenização, isto é, “a aquisição do carbono fixado de uma população, sendo esta população de algas verdes e/ou cianobactérias”, é uma forma comum e amplamente distribuída de nutrição. A tabela 1 apresenta as estratégias de obtenção de carbono pelos fungos e demonstra que uma em cada cinco espécies de fungos é liquenizada. Alguns fungos liquenizados pertencem a ordens com uma uniforme estratégia nutricional, outros, entretanto a ordens com diversas estratégias (HONEGGER, 1996).

O sucesso evolutivo do processo de liquenização pode ser comprovado pelo seu sucesso ecológico. Cerca de 8% dos ecossistemas terrestres apresentam líquens como comunidades clímax (Honegger, 1991). Dentre todos os fungos, os que melhor se adaptaram a esta estratégia são os Ascomycetos. Destes cerca de 46% das espécies são liquenizadas, o que corresponde a 98% de todas as espécies de fungos liquenizados.

Uma das questões mais importantes na liquenologia diz respeito à origem do processo de liquenização. A mais antiga origem da simbiose líquênica na evolução dos Ascomycetos data do período Devoniano, há aproximadamente 400 milhões de anos, demonstrando que fungos liquenizados são um antigo grupo ecológico. Atualmente a taxonomia clássica reconhece fungos liquenizados em doze ordens de Ascomycetos, dez das quais exclusivas de fungos liquenizados (APTROOT, 1998).

GARGAS e colaboradores (1995), utilizando técnicas de biologia molecular, desenvolveram o primeiro estudo filogenético envolvendo dados moleculares de fungos liquenizados e não liquenizados. Estes autores sugerem cinco origens diferentes de liquenização, sendo duas delas em Ascomycetos, correspondendo às ordens Arthoniales e Lecanorales. Mais recentemente, novos dados mostraram que o processo de perda da

liquenização é mais comum que o seu ganho, suportando que a origem da liquenização dentro de ascomicetos é muito anterior do que se previamente acreditava (LUTZONI et. al, 2001). Este estudo também demonstra que as principais linhagens de fungos não liquenizados, entre eles *Penicillium* e *Aspergillus*, tem origem em ancestrais liquenizados. Embora mais dados a respeito sejam necessários, fica claro que os líquens não são apenas uma parte integrante dos fungos, mas sim uma importante chave para entender sua evolução, particularmente dos Ascomicetos.

TABELA 1: ESTRATÉGIAS DE OBTENÇÃO DE CARBONO FIXADO DOS FUNGOS

Estratégia	%
<i>Degradação de matéria orgânica morta</i>	
Sapófitas	45-50
<i>Simbiose com autótrofos ou heterótrofos</i>	
<i>Simbiose – Parasitismo</i>	
Cianobactérias	
Algas	
Fungos (incluindo líquens)	20
Animais	
Humanos	
<i>Simbiose – Mutualismo</i>	
Micorrizas	8
Líquens	21

Fonte: HONNEGER, 1996.

Atualmente um grande projeto vem unindo esforços de micólogos do mundo inteiro visando reconstruir a história evolutiva dos fungos. O projeto AFTOL (*Assembling the Fungal Tree Of Life*) gerou sua primeira publicação em 2004 (LUTZONI et al. 2004) e espera, em breve, determinar entre outros tópicos a origem do processo de liquenização em fungos.

O Laboratório de Química de Carboidratos da UFPR há muitos anos vem trabalhando com a caracterização estrutural de polissacarídeos. Dentre as diversas fontes biológicas estudadas, podemos ressaltar o estudo de polissacarídeos de líquens como aqueles apresentou um maior número de moléculas e trabalhos publicados. Os primeiros

trabalhos com polissacarídeos de líquens neste laboratório datam de 1984, (GORIN & IACOMINI et al., 1984) e desde então diversas moléculas, inéditas ou não foram descritas (SASSAKI et al., 2002). Da íntima relação existente entre os parceiros desta simbiose surgiu o interesse pelo estudo de outras moléculas como glicolipídeos e ácidos graxos (MACHADO et al., SASSAKI et al., 2001). Todos estes trabalhos convergiram para uma única questão: **Qual é o papel de cada parceiro, bem como da simbiose, na produção das moléculas encontradas nos líquens?**

No intuito de responder esta questão, deu-se início no Laboratório de Química de Carboidratos da UFPR o estudo de isolamento e cultivo dos micobiontes e fotobiontes de líquens, e conseqüente estudo comparativo de suas moléculas com àquelas do líquen. Este trabalho foi desenvolvido em colaboração com a Dr. Elfie Stocker- Wörgötter da Universität Salzburg, Áustria.

Os primeiros resultados, obtidos para líquens do gênero *Ramalina*, demonstraram que os polissacarídeos produzidos pelo micobionte são os mesmos que aqueles produzidos pelo líquen, em contrapartida os polissacarídeos produzidos pela alga não haviam sido anteriormente observados na associação (CORDEIRO et al, 2004 a, b, c).

Após o processo de isolamento dos simbiontes, existia a necessidade de confirmar a identidade dos simbiontes obtidos, verificar se as culturas correspondiam realmente ao organismo presente na simbiose. Para isto foi utilizada a metodologia de análise molecular, através da comparação das regiões ITS rDNA do líquen, seu micobionte e seu fotobionte. Este trabalho foi desenvolvido em colaboração com o Prof. Dr. Martin Grube da Karl-Franzens Universität, na cidade de Graz, Áustria.

Durante a análise dos fotobiontes, foi verificado que as seqüências ITS rDNA obtidas eram distantes daquelas conhecidas para *Trebouxia* e *Asterochloris*, podendo representar uma linhagem exclusiva de ambientes tropicais. Sendo assim o estudo da diversidade de fotobiontes de líquens passou a ser um importante tópico a ser estudado, gerando uma outra importante questão: **Poderiam estas algas corresponder a uma nova linhagem de fotobiontes de líquens?**

Desta maneira, o objetivo do presente trabalho foi focado em responder essas duas questões principais. Os resultados foram organizados em 4 capítulos, os quais serão aqui apresentados.

Capítulo 1: Fotobiontes de fungos liquenizados.

1.1 Introdução:

Cerca de 47 gêneros de algas e cianobactérias são encontrados como fotobiontes em associações liquênicas. As associações com algas verdes correspondem a 85% de todas as associações, 10% delas são com cianobactérias e 3 a 4 % dos líquens apresentam simbiose com ambos os grupos simultaneamente (HONNEGER, 1991).

Quando comparados ao seu parceiro micobionte, os fotobiontes de líquens são pouco conhecidos e estudados. A identidade dos fotobiontes é conhecida para menos de 2% das espécies de líquens estudados até o momento (HONNEGER, 1991; HELMS, 2003). Este fato se deve principalmente à dificuldade de se reconhecer a espécie da alga em questão. Quando em associação, o fotobionte não apresenta caracteres essenciais para a determinação de sua espécie, como seu ciclo de vida completo e forma de cloroplasto constante (quando presente). Estes caracteres só são possíveis de serem observados em culturas (FRIEDL, 1989).

O principal fotobionte de líquens é a alga verde do gênero *Trebouxia*, a qual segundo POELT (1973) está presente em 61% das associações liquênicas, fazendo com que, conseqüentemente, seja também o fotobionte mais estudado. Os primeiros autores que publicaram uma descrição específica e ilustrações de uma alga verde cocóide semelhante a *Trebouxia* foram FAMINTZIN & BARANIETZKY (1867) e SCHWENDENER (1867) e a denominaram *Cystococcus humicola*. Posteriormente PUMALY, em 1924, baseado nas características anteriormente publicadas por TREBOUX (1912) sugeriu o nome *Trebouxia arboricola* para todas as algas isoladas do líquen *Xanthoria parietina*.

De acordo com Ettl & Gärtner (1995) o gênero *Trebouxia* é descrito como:

“Algas verdes cocóides que formam pacotes de autósporos em formato tetraédrico ou em grandes complexos celulares. A forma celular vai de esférica a elíptica. Parede celular fina, ocasionalmente apresenta um espessamento unilateral, sem bainha gelatinosa. Cloroplastos em células adultas assumem uma posição central e desenvolvem lobos e invaginações marginais. Cloroplastos apresentam um ou múltiplos pirenóides, os quais

apresentam (algumas espécies) ou não, uma bainha de amido. Amido é geralmente depositado em grãos no estroma do cloroplasto. O núcleo está sempre posicionado excentricamente em uma pronunciada invaginação do cloroplasto. Somente reprodução assexuada é conhecida, através da formação de autósporos ou zoósporos, este bi-flagelados e com estigma.”

Os principais caracteres para a identificação específica do gênero são: a forma do cloroplasto, ciclo de vida e ultra-estrutura dos pirenóides (FRIEDL, 1989a; Ettl & GÄRTNER, 1995). Esta última é a única característica possível de ser determinada em associação, ou seja, no estado liquênico, porém sua observação só é possível através de microscopia eletrônica (FRIEDL, 1989a, 1989b).

A classificação do gênero *Trebouxia* é um assunto que foi amplamente discutido e atualmente aparenta estar se encaminhando para um consenso. Dados morfológicos do ciclo de vida e mais atualmente moleculares sugerem que o gênero *Trebouxia* é um grupo parafilético (ARCHIBALD, 1975; HILDRET & AHMADJIAN, 1981, TSCHERMAK-WOES, 1989; FRIEDL & ZELTNER, 1994; FRIEDL & ROKITTA, 1997, PIERCEY-NORMORE & DEPRIEST, 2001; HELMS, 2003).

A presença de dois tipos morfológicos de *Trebouxia* foi primeiramente descrita por WAREN (1920) o qual, baseado na formação de seus esporos, sugeriu os subgêneros *Ecystococcus* e *Eleuterococcus*. AHMADJIAN (1960) incluindo dados morfológicos sugere a presença dos tipos *Trebouxia* tipo I e *Trebouxia* tipo II. Entretanto somente em 1975, ARCHIBALD, baseado na ontogenia dos diferentes tipos de células reprodutivas imóveis, foi a primeira a propor a divisão do gênero *Trebouxia* em dois gêneros, estando estes em duas ordens diferentes: *Trebouxia* (Chlorosarcinales) e *Pseudotrebouxia* (Chlorococcales).

Em 1981, HILDRET & AHMADJIAN desenvolveram um estudo que, além de confirmar as principais características para a classificação dos dois gêneros, descreveu novas espécies para ambos, incluindo as espécies tropicais *Pseudotrebouxia galapagensis* e *P. higginsiae*. Entretanto neste mesmo trabalho, os autores observaram a presença de alta variabilidade de caracteres sugerindo que os critérios adotados para a divisão dos gêneros poderiam ser “muito restritivos”.

Talvez um dos trabalhos mais importantes em relação aos fotobiontes de líquens foi desenvolvido por AHMADJIAN & JACOBS (1981), no qual os autores tentaram restabelecer a

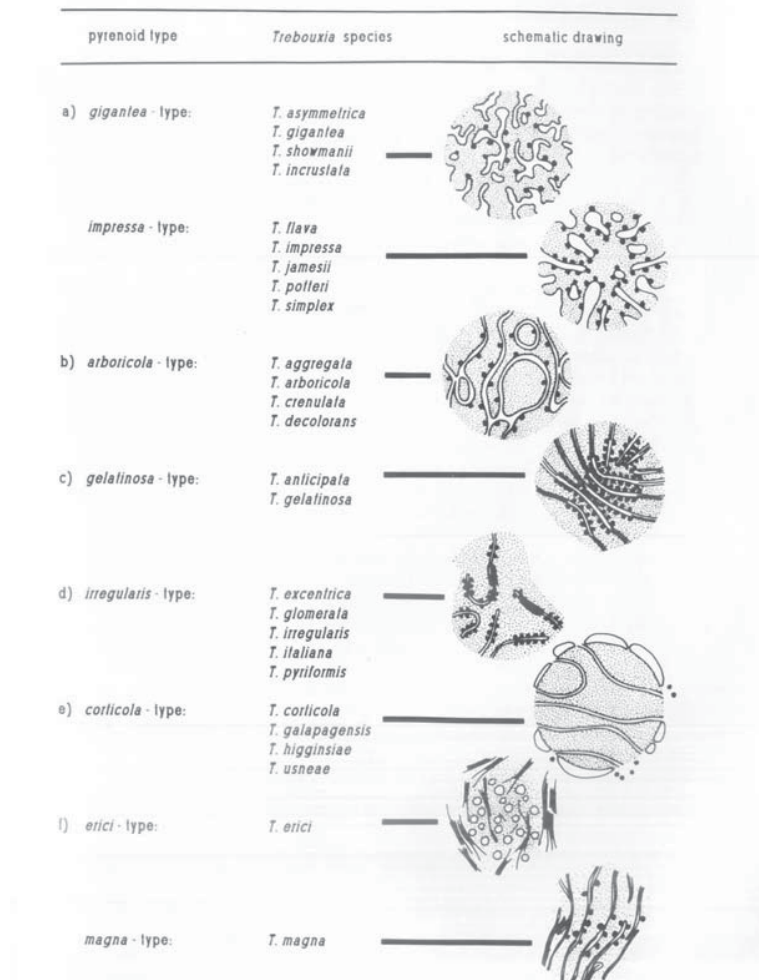
simbiose, através de um processo de ressíntese, do líquen *Cladonia cristatella*. Para isto foram utilizadas diversas algas, originadas ou não, de líquens. Verificaram que a maioria das espécies de *Trebouxia* foi capaz de formar esquâmulos (estrutura líquênica inicial presente nos líquens do gênero *Cladonia*), enquanto que todas as espécies de *Pseudotrebourgia* e *T. acticipata* e *T. crenulata* foram parasitadas pelo micobionte. Estes dados mostram claramente que existem diferenças no reconhecimento destes dois grupos pelo micobionte.

Trabalhos posteriores, embora reconhecendo a presença de dois grupos distintos em relação à formação de células reprodutivas não móveis (TSCHERMAK-WOESS, 1982; GÄRTNER, 1985; TSCHERMAK-WOESS, 1989), rejeitaram a divisão do gênero *Trebouxia*. Segundo eles não existiam diferenças ontogênicas na formação dos diferentes tipos células reprodutivas, justificativa que foi utilizada por ARCHIBALD (1975) para a divisão dos gêneros em diferentes ordens.

No ano de 1989 dois trabalhos independentes contribuíram muito para a classificação do gênero. FRIEDL (1989a) através de estudos baseados em ultra-estrutura dos pirenóides e tilacóides corroborou a hipótese de que o gênero *Trebouxia* não deveria ser dividido. Entretanto, o autor sugere a utilização da ultra-estrutura dos pirenóides (figura 1.1) como um caráter a ser utilizado na taxonomia das espécies de *Trebouxia*. Meses mais tarde TSCHERMAK-WOESS (1989) sugere a divisão do gênero *Trebouxia* nos subgêneros *Trebouxia* (produz autósporos, aplanosporos e zoósporos; cloroplasto central durante divisão) e *Eleutherococcus* (apenas aplanosporos e zoósporos; cloroplasto parietal durante a divisão). No mesmo trabalho TSCHERMAK-WOESS (1989) ainda inclui o fotobionte *Asterochloris phycobiontina*, isolada do líquen *Anzina carnoenivea* (descrito como *Varicellaria carneonivea*) (TSCHERMAK-WOESS, 1980), como pertencente ao gênero *Trebouxia* subgenero *Eleutherococcus*. A autora ainda sugere que no futuro em uma possível elevação deste ao nível de gênero, sendo que aquele que não produzisse autósporos deveria receber a denominação *Asterochloris* (TSCHERMAK-WOESS, 1989).

FRIEDL, (1993) analisando 26 espécies, observou a presença de dois ciclos celulares distintos (denominados A e B) baseados na formação de autósporos e no desenvolvimento dos zoósporos em células vegetativas.

FIGURA 1.1: ULTRA-ESTRUTURA DOS PIRENÓIDES PRESENTES NOS FOTOBIONTES DO GÊNERO *Trebouxia*. EXTRAÍDO DE FRIEDL, 1989.



A partir de 1994, com a aplicação de análises moleculares, a taxonomia de *Trebouxia* mudou novamente, desta vez não apenas em nível de gênero, mas também de família, classe e ordem.

FRIEDL & ZELTNER (1994) através de comparações de seqüências 18S de rDNA (subunidade menor do RNA ribossomal) confirmaram dados ultra-estruturais (MELKONIAN & PEVELING, 1988) que agrupavam três espécies da classe Chlorophyceae: *Trebouxia* (ordem Chlorococcales), *Microthamnion kuetzingianum* (ordem Chaetophorales) e *Pleusrastum terrestre* (ordem Chlorosarcinales) em um grupo distinto dentro das algas verdes, denominado ordem Microthamniales (Classe Pleurastrophyceae). Estes mesmos autores observaram também uma linhagem independente dentro da ordem

Microthamniales, denominada “grupo de algas liquênicas” composta por espécies de *Trebouxia*, *Myrmecia* e *Friedmannia*.

Porém em 1995, Thomas Friedl (FRIEDL, 1995), utilizou-se de um maior número de seqüências para reorganizar a filogenia de Chlorophyta, a qual perdura até os dias de hoje. Nesta nova classificação, o “grupo de algas liquênicas” (FRIEDL & ZELTNER, 1994) está presente na família Trebouiaceae, ordem Trebouxiales, classe Trebouiophyceae. Análises filogenéticas posteriores, baseadas em Introns do grupo I de rDNA (BHATTACHARYA et. al, 1996) confirmaram a filogenia proposta por FRIEDL (1995).

FRIEDL e ROKITTA (1997) utilizando análises de 26S rDNA (subunidade maior do RNA ribossomal) confirmaram os dados anteriores de 18S (FRIEDL & ZELTNER, 1994), além disto este trabalho indicou que *Trebouxia magna* e *T. erici* estão mais próximas de *Myrmecia biatorellae* do que de outras espécies de *Trebouxia*. Estes dados confirmaram com precisão pela primeira vez a origem parafilética do gênero *Trebouxia*. Os autores sugerem ainda a morfologia do cloroplasto e a ultra-estrutura de pirenóides como caracteres importantes para a distinção intra-específica em *Trebouxia*. Além disto, afirmam que caracteres como: a ausência de uma matriz distinta nos pirenóides e o cloroplasto assumindo uma posição parietal em alguns estágios do ciclo de vida, podem ser utilizados em uma possível e futura divisão de *Trebouxia* em dois gêneros. Em contrapartida, afirmam que a formação de autósporos, não se apresenta como um marcador confiável na classificação de *Trebouxia*, derrubando de vez as teorias que utilizavam este critério para separação deste em dois gêneros (ARCHIBALD, 1975; HILDRETH & AHMADJIAN, 1981) ou em dois subgêneros (TSCHERMACK-WOESS, 1989).

Finalmente em 1998, RAMBOLD e colaboradores propõem a divisão de *Trebouxia* nos gêneros *Trebouxia* e *Asterochloris*, fundamentados em uma compilação de dados, incluindo a morfologia, análises moleculares e a especificidade de relacionamento entre os fotobiontes e seus respectivos micobiontes, observando padrões altamente seletivos. Os autores verificaram que enquanto *Trebouxia* é encontrada associada com espécies incluídas na subordem Lecanoriinea, a subordem Cladoniineae apresenta-se liquenizada basicamente por *Asterochloris*. Esta teoria corrobora os dados de AHMADJIAN & JACOBS (1981) que, em estudos de ressíntese, observaram que *Cladonia cristatella* forma esquâmulos com

Asterochloris (como *Trebouxia*) e parasita *Trebouxia* (como *Pseudotrebouxia*). A tabela 1.1 apresenta os caracteres utilizados na separação dos gêneros *Trebouxia* e *Asterochloris*

TABELA 1.1: CARACTERES UTILIZADOS NA SEPARAÇÃO ENTRE *TREBOUXIA* E *ASTEROCHLORIS*. EXTRAÍDO DE HELMS, 2003.

	Espécie de <i>Trebouxia</i>	Pirenóide (tipo) ^a	Posição do cloroplasto antes da divisão ^b	Presença de Autósporo ^c /Ciclo Celular ^d	Compatibilidade com <i>Cladonia Cristatella</i> ^e
<i>Trebouxia</i>	<i>T. decolorans</i>	<i>arboricola</i>	C	+A	-
	<i>T. arboricola</i>	<i>arboricola</i>	C	+A	n.a.
	<i>T. aggregata</i>	<i>arboricola</i>	C	+A	-
	<i>T. crenulata</i>	<i>arboricola</i>	C	+A	-
	<i>T. jamesii</i>	<i>impressa</i>	C	+A	-
	<i>T. asymmetrica</i>	<i>gigantea</i>	C	+A	n.a.
	<i>T. showmanii</i>	<i>gigantea</i>	C	+A	-
	<i>T. gigantea</i>	<i>gigantea</i>	C	+A	-
	<i>T. incrustata</i>	<i>gigantea</i>	C	+A	n.a.
	<i>T. flava</i>	<i>impressa</i>	C	+B	n.a.
	<i>T. impressa</i>	<i>impressa</i>	C	+A	-
	<i>T. potteri</i>	<i>impressa</i>	C	+A	-
	<i>T. gelatinosa</i>	<i>gelatinosa</i>	C	-B	-
	<i>T. anticipata</i>	<i>gelatinosa</i>	C	-B	-
	<i>T. useae</i>	<i>corticola</i>	C	+B	-
	<i>T. corticola</i>	<i>corticola</i>	C	+A	-
	<i>T. galapagensis</i>	<i>corticola</i>	C	+A	-
	<i>T. higginsiae</i>	<i>corticola</i>	C	+A	-
	<i>T. simplex</i>	<i>impressa</i>	C	+A	n.a.
<i>Asterochloris</i>	<i>T. irregularis</i>	<i>irregularis</i>	P	-B	n.a.
	<i>T. glomerata</i>	<i>irregularis</i>	P	-B	+
	<i>T. pyriformis</i>	<i>irregularis</i>	P	-B	+
	<i>T. italiana</i>	<i>irregularis</i>	P	?B	+
	<i>T. excentica</i>	<i>irregularis</i>	P	-B	+
	<i>T. magna</i>	<i>magna</i>	P	?B	+
	<i>T. erici</i>	<i>erici</i>	P	-B	+

a: Tipos de pirenóide de acordo com Friedl (1989), figura 1.1; **b:** Posição do cloroplasto durante a divisão (Ahmadjian, 1960; Hildret & Ahmadjian, 1981; Gärtner, 1985), c= central e lobado, p=parietal e achatado; **c:** Presença de autósporo de acordo com Tschermak-Wöess (1989); **d:** Ciclo celular A e B (Friedl, 1989); **e:** Compatibilidade com *Cladonia cristatella* (Ahmadjian & Jacobs, 1981).

Todos os estudos filogenéticos desenvolvidos até o momento utilizaram seqüências conservadas de DNA (como 18S e 26S rDNA), as quais são as mais adequadas para uma análise comparativa de grandes grupos taxonômicos, como famílias, ordens, gêneros, etc.... Entretanto, para um estudo que busque resolver questões intra-específicas, necessita-se de outras ferramentas de estudo, seqüências menos conservadas, como as regiões intergênicas existentes entre 18S e 26S rDNA (figura 1.2), ou simplesmente regiões ITS rDNA (internal transcribes spacer) (FRIEDL & ROKITA, 197).

FIGURA 1.2: LOCALIZAÇÃO DAS PRINCIPAIS SEQÜÊNCIAS UTILIZADAS EM ESTUDOS FILOGENÉTICOS



FRIEDL e colaboradores (2000) desenvolveram uma análise comparativa obtida a partir de estudos filogenéticos baseados em seqüências ITS rDNA e Introns do grupo I de várias culturas de *Trebouxia*. Este trabalho demonstrou a ocorrência de cinco clados principais dentro da árvore filogenética de *Trebouxia*. Além disto, o seqüenciamento demonstrou que diferentes culturas de *Trebouxia* obtidas do banco de algas da Universidade do Texas (UTEX), como por exemplo: *T. higginsiae*/ *T. galapagensis* e *T.corticola* e *T.usneae*, apresentam a mesma seqüência ITS, podendo estas, corresponder a uma mesma espécie.

Uma das maiores dificuldades no estudo de fotobiontes, e conseqüente razão para a escassez de dados sempre foi a necessidade de se isolar o fotobionte para o desenvolvimento dos estudos comparativos, seja através de métodos morfológicos, ciclo de vida e até mesmo moleculares. Entretanto em 2000 o desenvolvimento de *primers* específicos para a região ITS de *Trebouxia* (KROKEN & TAYLOR, 2000; DAHLKILD et al., 2001) permitiu a amplificação de fragmentos de DNA de origem do fotobionte a partir de extratos brutos de líquen, possibilitando assim um estudo populacional em grande escala.

A partir do desenvolvimento de *primers* específicos, os primeiros estudos populacionais foram desenvolvidos. Inicialmente o trabalho foi focado apenas em alguns grupos taxonômicos, como o gênero *Letharia* (KROKEN & TAYLOR, 2000) e a família

Physciaceae (DAHLKILD et al., 2001; HELMS et al., 2001). Estes estudos demonstraram uma árvore filogenética com quatro clados principais, semelhante àquela encontrada por Friedl et al. (2000). Além disso, KROKEN & TAYLOR (2000) observaram que os principais grupos encontrados correspondem à classificação previamente descrita por FRIEDL (1989a, b) com relação a ultraestrutura do pirenóide. O Clado I apresenta como principal representante as linhagens *T. arboricola*, *T. asymetrica* (pirenóide tipo *gigantea*). O Clado II (juntamente com o Clado III) apresenta as linhagens *T. impressa* e *T. gelatinosa* (pirenóide tipo *impressa* e *gelatinosa*), o Clado IV apresenta as linhagens *T. higgensiae* e *T. corticola* (pirenóide tipo *corticola*). O último clado é representada pela linhagem *T. jamesii* (pirenóide tipo *impressa*).

Com o avanço das técnicas moleculares, a estrutura taxonômica baseada em análises moleculares muitas vezes não apresentou a mesma topologia resultante de estudos morfológicos previamente realizados. No intuito de evitar mudanças frequentes no nome das espécies, recentemente, Gert HELMS (2003), analisando cerca de 310 seqüências de diversos grupos liquênicos (principalmente Physciaceae) propôs uma nova nomenclatura para o gênero *Trebouxia*, baseada em letras e números.

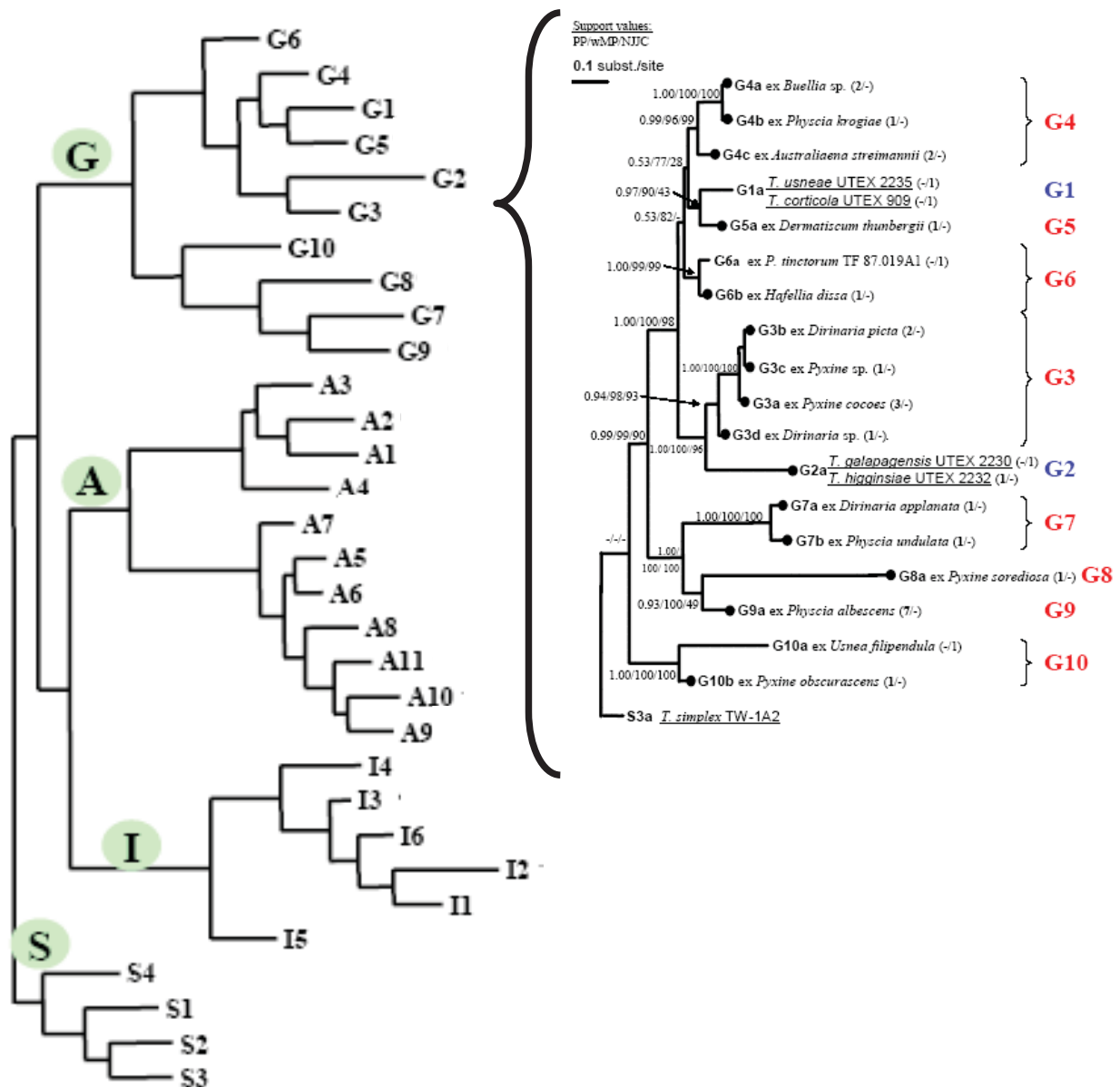
A árvore obtida por HELMS apresenta a mesma topologia que as anteriormente descritas (FRIEDL et al., 2000; KROKEN & TAYLOR, 2000; HELMS et al., 2001), entretanto os números I, II (incluindo o clado III), IV e V foram respectivamente substituídos pelas letras A (de *T. arboricola*), I (*T. impressa*), G (*T. galapagensis*) e S (*T. simplex*, antiga *T. jamesii*).

Nesta nova nomenclatura o menor nível taxonômico seria a variante ITS, em seguida grupos monofiléticos destas variantes seriam unidos em subclados, e grupos monofiléticos de subclados unidos em clados.

O limite de variabilidade admitido para as variantes ITS é de 2% em suas seqüências, sendo essa indicada por uma letra minúscula. O nível acima é representado pelos subclados (este nível equivaleria ao nível taxonômico de espécie) e é representado por um número precedendo a letra minúscula, O maior nível taxonômico, representado por letras maiúsculas, é o Clado. Para sua definição foram adotadas os clados monofiléticos citadas anteriormente (A, I, G ou S). Desta maneira a classificação de *Trebouxia galapagensis* passaria a ser G2a (figura 1.3).

Os dados apresentados por HELMS (2003) mostram uma interessante topologia com relação à distribuição geográfica e ecológica dos fotobiontes. O autor observa que os fotobiontes obtidos a partir de líquens de regiões tropicais se distribuem apenas duas clados: Clado G, contendo a maior variabilidade com 10 subclados e o clado I, com a presença de apenas 1 subclado.

FIGURA 1.3: FILOGENIA DO GÊNERO *Trebouxia* PROPOSTA POR HELMS (2003). OBSERVAR A PRESENÇA DE 4 CLADOS PRINCIPAIS. DETALHE APRESENTA UMA AMPLIAÇÃO DA CLADO G. CÓDIGO APRESENTADO EM CONJUNTO O NOME DA AMOSTRA (EX: **G2A** – *T. galapagensis* UTEX 2230) REPRESENTA A NOVA NOMENCLATURA PROPOSTA PELO AUTOR.



Com relação a *Asterochloris* (*sensu* RAMBOLD et al., 1998), trabalhos recentes (PIERCE-NORMORE & DEPRIEST, 2001; YAHR et al., 2004) determinaram a topologia da árvore evolutiva para este “gênero”. Os resultados demonstraram uma alta similaridade (> de 95%) entre todas as seqüências obtidas e a árvore demonstra dois principais Clados, Clado I e Clado II (PIERCE-NORMORE & DEPRIEST, 2001). Clado I apresenta 3 genótipos principais e é altamente suportado. O Clado II apresenta uma maior diversidade de genótipos e é dividido em dois subclados: IIa (contendo 11 genótipos) e IIb (contendo 11 genótipos)(YAHR et al., 2004).

PIERCE-NORMORE e DEPRIEST (2001) na tentativa de comprovar se a alta especificidade deste fotobionte com a subordem Cladoniiae poderia ser originada em um processo de co-evolução dentro destes grupos, utilizaram análises comparativas da topologia obtidas pela ITS rDNA de ambos simbiontes obtidos de amostras de líquens do mundo inteiro. Os resultados obtidos rejeitaram a hipótese de co-evolução, sugerindo que a “troca” de fotobionte ocorre freqüentemente neste grupo de líquens.

Em um trabalho mais recente do mesmo grupo (YAHR et al., 2004) utilizando uma amostragem maior em uma área mais restrita (Florida – EUA) foi observado uma alta especificidade e seletividade fúngica por fotobiontes. Os autores observaram que das oito espécies de *Cladonia* estudadas seis apresentavam uma alta especificidade (taxa em que a espécie de fungo foi encontrada com fotobiontes do mesmo Subclado) com um dos três subclados de fotobionte. Em contrapartida observou-se também uma alta seletividade (freqüência que o micobionte é encontrado associado com determinado genótipo em um sítio de coleta) pelo genótipo de fotobionte de acordo com o ambiente. A partir destes dados os autores concluem que: “o fungo pode selecionar a sua alga “favorita” a partir de um “pool” de fotobionte localmente disponível”.

Vários estudos utilizando outros fotobiontes mostram que há uma clara diferença em relação a seletividade por fotobiontes em líquens. Somente duas espécies de *Trebouxia* foram observadas em espécies foliosas de Physciaceae (DAHLKILD et al., 2001). Em contrapartida, em *Parmelia* e *Umbilicaria*, vários fotobiontes foram encontrados em diferentes talos de uma mesma espécie de líquen (FRIEDL, 1989; ROMEIKE et al., 2002). BECK et al. (1998; 2002) indicaram que espécies de algas verdes podem ser selecionadas pelo micobionte a partir de um “pool de algas localmente disponível”. Uma situação similar

foi encontrada também em líquens associados com cianobactérias (RIKKINEN et al., 2003). Este “pool” de fotobiontes compreende a um número de espécies que estão adaptadas a um certo ambiente. Ainda não é claro como a composição deste “pool” muda de acordo com diferentes regiões geográficas.

Muito pouco se sabe sobre a biogeografia de fotobiontes de líquens, especialmente no que diz respeito às regiões tropicais. Entretanto, podemos dizer que a ausência de dados sobre regiões reconhecidamente ricas em biodiversidade, existentes atualmente, nos leva a uma subestimação da real diversidade de fotobiontes liquênicos.

1.2. Objetivos

1.2.1. Objetivo geral.

Identificar os fotobiontes de líquens, dos gêneros *Trebouxia* e *Asterochloris*, existentes em alguns ecossistemas presentes no litoral do Paraná – Brasil.

1.2.2. Objetivos específicos.

- Determinar, através de análise das seqüências ITS rDNA, a identidade dos fotobiontes de diversos líquens coletados no litoral do Paraná.
- Construir uma hipótese filogenética para os fotobiontes analisados, comparando as seqüências obtidas com aquelas existentes na literatura.
- Relacionar a topologia obtida na hipótese filogenética com o ambiente, buscando elaborar uma possível análise filogeográfica.

1.3. Material e métodos

1.3.1. Material

Amostras de líquens utilizadas neste estudo foram coletadas em diferentes ecossistemas presentes no litoral do Paraná (como: Manguezal, Restinga, Floresta Ombrófila Mista, etc...). A completa lista dos líquens utilizados neste estudo, bem como o mapa contendo a localização dos pontos de coleta estão indicadas nas tabelas 1.2. e 1.3 e figura 1.4.

TABELA 1.2: LISTA DOS LIQUENS ANALISADOS NESTE ESTUDO

<i>Amostra</i>	<i>Líquen (Taxa)</i>	<i>Ponto Coleta</i>	<i>Herbário (voucher)</i>
FB22	<i>Ramalina farinaceae</i>	Slovenia	GZU
FB30	<i>Ramalina fraxinea</i>	Slovenia	GZU
JB-AO5	<i>Alectoria ochroleuca</i>	Chile	GZU
JB-CA1	<i>Cetraria aculeata</i>	Chile	GZU
JB-CI1	<i>Cetraria islandica</i>	Chile	GZU
JB-CM6	<i>Alectoria ochroleuca</i>	Chile	GZU
JB-FN1	<i>Flavocetraria nivalis</i>	Chile	GZU
LC-1	<i>Cladina confusa</i>	1	UPCB
RC-1	<i>Teloschistes flavicans</i>	1	UPCB
1	<i>Physcia sinuosa</i>	7	UPCB
3	<i>Heterodermia sp.</i>	9	UPCB
4	<i>Physcia atrostriata</i>	6	UPCB
5	<i>Pyxine sp.</i>	6	UPCB
6	<i>Heterodermia obscurata</i>	3	UPCB
7	<i>Heterodermia flabellata</i>	3	UPCB
8	<i>Heterodermia cesarettiana</i>	3	UPCB
9	<i>Heterodermia vulgaris.</i>	3	UPCB
10	<i>Heterodermia sp.</i>	3	UPCB
11	<i>Heterodermia corallophora</i>	10	UPCB
12	<i>Physciaceae</i>	6	UPCB
13	<i>Physcia sinuosa</i>	6	UPCB
14	<i>Physcia sinuosa</i>	6	UPCB
15	<i>Physcia sinuosa</i>	6	UPCB
16	<i>Heterodermia sp.</i>	15	UPCB
17	<i>Physciaceae</i>	10	UPCB
18	<i>Heterodermia sp.</i>	16	UPCB
19	<i>Heterodermia sp.</i>	11	UPCB
20	<i>Hypotrachyna sp.</i>	16	UPCB
21	<i>Physcia sp.</i>	5	UPCB
22	<i>Physcia sp.</i>	5	UPCB
23	<i>Heterodermia sp.</i>	5	UPCB

24	<i>Heterodermia sp.</i>	10	UPCB
25	<i>Physcia sp.</i>	8	UPCB
27	<i>Physcia erumpens</i>	9	UPCB
28	<i>Physcia sp.</i>	3	UPCB
30	<i>Physcia sp.</i>	3	UPCB
31	<i>Heterodermia sp.</i>	3	UPCB
31	<i>Heterodermia sp.</i>	3	UPCB
33	<i>Heterodermia sp.</i>	3	UPCB
36	<i>Heterodermia sp.</i>	12	UPCB
37	<i>Heterodermia obscurata</i>	3	UPCB
38	<i>Heterodermia obscurata</i>	3	UPCB
39	<i>Heterodermia flabelata</i>	3	UPCB
40	<i>Heterodermia flabelata</i>	3	UPCB
42	<i>Physcia sp.</i>	7	UPCB
46	<i>Teloschistes flavicans</i>	9	UPCB
47	<i>Teloschistes flavicans</i>	8	UPCB
48	<i>Teloschistes flavicans</i>	7	UPCB
49	<i>Teloschistes flavicans</i>	6	UPCB
50	<i>Teloschistes flavicans</i>	1	UPCB
51	<i>Teloschistes flavicans</i>	3	UPCB
51	<i>Teloschistes flavicans</i>	3	UPCB
52	<i>Teloschistes flavicans</i>	3	UPCB
53	<i>Teloschistes exilis</i>	3	UPCB
54	<i>Teloschistes exilis</i>	2	UPCB
55	<i>Teloschistes exilis</i>	6	UPCB
56	<i>Teloschistes exilis</i>	9	UPCB
58	<i>Ramalina peruviana</i>	3	UPCB
59	<i>Ramalina solediosa</i>	9	UPCB
60	<i>Ramalina solediosa</i>	7	UPCB
61	<i>Ramalina solediosa</i>	7	UPCB
63	<i>Ramalina gracilis</i>	1	UPCB
65	<i>Ramalina sp.</i>	1	UPCB
66	<i>Ramalina sp.</i>	1	UPCB
67	<i>Ramalina peruviana culture</i>	1	UPCB
68	<i>Ramalina sprengelli</i>	1	UPCB
69	<i>Ramalina sp.</i>	3	UPCB
70	<i>Ramalina anceps</i>	9	UPCB
71	<i>Ramalina sp.</i>	1	UPCB
74	<i>Ramalina celastri</i>	3	UPCB
75	<i>Ramalina pusiola</i>	3	UPCB
76	<i>Ramalina sp.</i>	9	UPCB
76	<i>Ramalina sp.</i>	9	UPCB
77	<i>Ramalina sp.</i>	3	UPCB
77	<i>Ramalina sp.</i>	3	UPCB
78	<i>Ramalina anceps</i>	6	UPCB
81	<i>Ramalina peruviana</i>	5	UPCB
101	<i>Usnea sp.</i>	6	UPCB
102	<i>Usnea sp.</i>	3	UPCB
103	<i>Usnea sp.</i>	3	UPCB

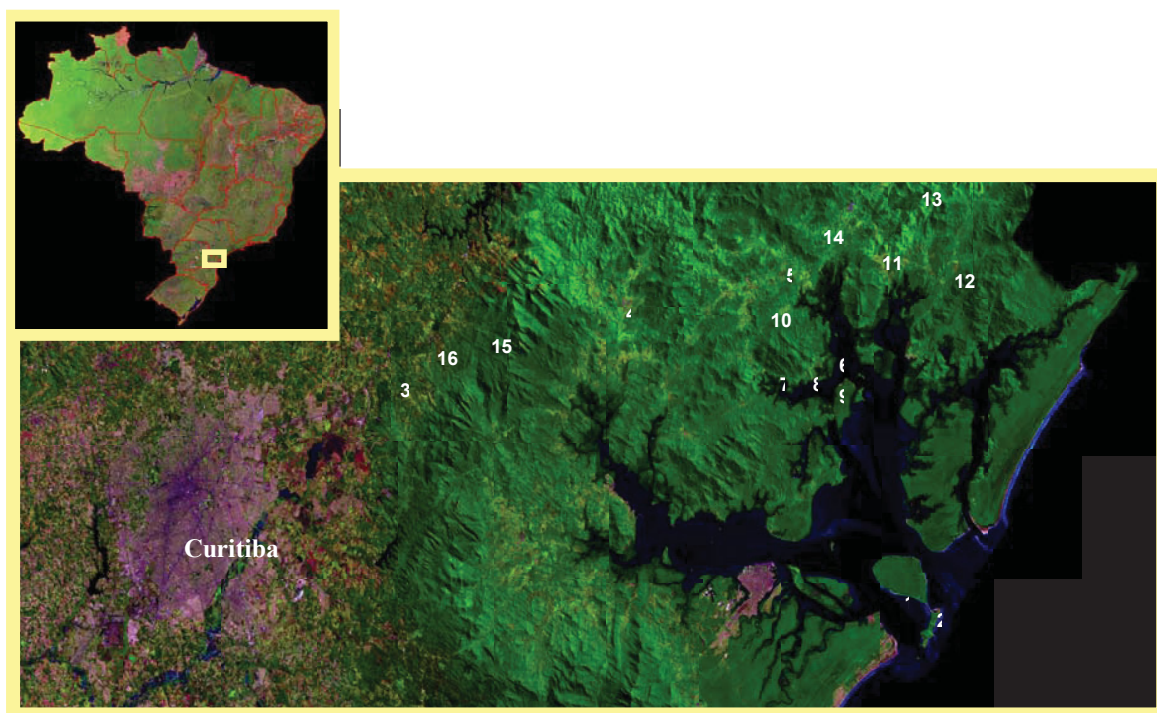
136	<i>Cladonia ceratophylla</i>	1	UPCB
136	<i>Cladonia ceratophylla</i>	1	UPCB
137	<i>Cladonia sp.</i>	6	UPCB
142	<i>Cladonia sp.</i>	9	UPCB
143	<i>Cladonia sp.</i>	15	UPCB
146	<i>Cladonia sp.</i>	10	UPCB
149	<i>Cladonia sp.</i>	16	UPCB
151	<i>Cladonia sp.</i>	13	UPCB
152	<i>Cladia agregatta</i>	13	UPCB
153	<i>Cladonia sp.</i>	5	UPCB
154	<i>Cladonia sp.</i>	3	UPCB

JB - amostras cedidas pelo Dr. Jarle Bjerke; FB- amostras cedidas por Bárbara Fetz; LC- cultura de fotobionte obtida pela Dr. Lucimara Cordeiro; RC- Cultura de fotobionte obtida por Rodrigo Reis. UPCB: Herbário do Setor de Ciências Biológicas da UFPR. GZU: Herbário da Universidade Karl-Franzens (Graz).

TABELA1.3.: LOCAL, ECOSSISTEMA E LOCALIZAÇÃO DOS PONTOS DE COLETA

Ponto	Ecossistema	Localização		Altitude
1	Restinga	25° 32' S	48° 20' O	0 m
2	Restinga	25° 34' S	48° 19' O	9 m
3	Floresta Ombrófila Mista	25° 26' 15" S	48° 03' 45" O	940 m
4	Floresta Ombrófila Densa	25° 14' 31" S	48° 44' 49" O	0 m
5	Área de Recuperação	Não Determinado		
6	Manguezal	25° 19' 31" S	48° 25' 49" O	0 m
7	Manguezal	25° 19' 51" S	48° 27' 40" O	0 m
8	Manguezal	25° 19' 04" S	48° 26' 41" O	0 m
9	Restinga	25° 19' 52" S	48° 25' 10" O	8 m
10	Área de Recuperação	25° 14' 36" S	48° 29' 38" O	13m
11	Floresta Ombrófila Densa	25° 13' 23" S	48° 16' 55" O	0 m
12	Área de Recuperação	25° 13' 23" S	48° 16' 55" O	14 m
13	Floresta Ombrófila Densa	25° 08' 22" S	48° 18' 20" O	900 m
14	Floresta Ombrófila Densa	25° 10' 51" S	48° 26' 07" O	150 m
15	Floresta Ombrófila Densa	25° 19' 59" S	48° 54' 01" O	870 m
16	Floresta Ombrófila Mista	25° 18' 36" S	48° 26' 05" O	917 m

FIGURA 1.4.: MAPA DE COLETA



MAPA DOS PONTOS DE COLETA. DESCRIÇÃO DOS PONTOS E LOCAIS DE COLETA NA TABELA 1.3. EXTRAÍDO DE MIRANDA & COUTINHO, 2004.

1.3.2. Extração de DNA, PCR e seqüenciamento

O DNA total foi extraído de acordo com uma modificação do método CTAB (CUBERO et al., 1999). Os extratos de DNA foram utilizados para as amplificações, através de reações de PCR, das regiões ITS, incluindo os genes 5.8S do DNA ribossomal. Os primers alga específicos ITS 1T e ITS 4T (KROKEN & TAYLOR, 2000, Tabela 1.4., 1.5.) foram utilizados para a amplificação do rDNA dos fotobiontes *Trebouxia*, seja de cultura ou isolados dos líquens intactos. Os primers ITS 1T e ITS4 (KROKEN & TAYLOR, 2000; WHITE et al., 1990; Tabela 1.4., Figura 1.5.) foram utilizados para a amplificação do fotobionte *Asterochloris*, seja de cultura ou isolados dos líquens intactos.

As amplificações foram realizadas em reações de 30µL (7,05 µl H₂O, 3 µl dNTPs [1 mM], 1.5 µl de cada primer [10 pM], 0,15 µl *Taq* DNA-polymerase, 12 µl extrato de DNA e 1,8 µl MgCl₂ [1,5mM]). As condições de amplificação foram: 35 ciclos com desnaturação a 95°C por 1 minuto, anelamento a 56°C por 1 minuto e alongamento a 72°C por 1 min e

30 s para o par de primers ITS1T/ITS4T. A temperatura de anelamento foi de 52°C para o par de primers ITS1T/ITS4. Os produtos de PCR foram limpos utilizando o kit QIAGEN quick spin columns (Qiagen), quantificadas em gel de agarose 1% e corados com brometo de etídio.

Ambas as fitas complementares foram seqüenciadas usando os primers ITS1T, ITS4T (KROKEN & TAYLOR, 2000), ITS 2T, ITS 3T (KROKEN & TAYLOR, 2000). O seqüenciamento foi realizado usando o kit de reação Dye Terminator Cycle Sequencing Ready (APPLERA, Vienna) de acordo com as instruções do produtor e a detecção foi realizada em um seqüenciador automático ABI 310 (APPLERA, Vienna). Os fragmentos seqüenciados de cada amostra foram montados em seqüências contíguas utilizando o software Autoassembler.

TABELA 1.4.: PRIMERS UTILIZADOS NAS ANÁLISES FILOGENÉTICAS

<i>Primer</i>	<i>Seqüência</i>	<i>Referência</i>
ITS 1T	5' – gga agg atc att gaa tct atc gt	KROKEN & TAYLOR, 2000
ITS 2T	3' - ttc gct gcg ttc ttc act gtt	KROKEN & TAYLOR, 2000
ITS 3T	5' – aac gat gaa gaa cgc agc gaa	KROKEN & TAYLOR, 2000
ITS 4T	3' – ggt tcg ctc gcc gct act a	KROKEN & TAYLOR, 2000
ITS 4	3' – tcc tcc gct tat tga tat gc	WHITE et al., 1990

FIGURA 1.5: LOCALIZAÇÃO DOS PRIMERS UTILIZADOS NAS ANÁLISES FLOGENÉTICAS.

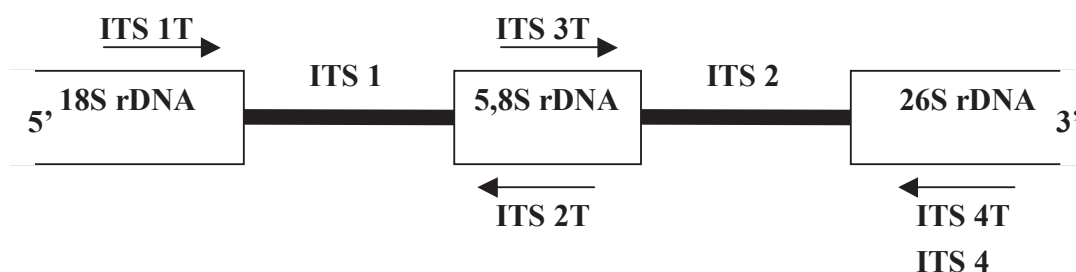


TABELA 1.5.: SEQUÊNCIAS UTILIZADAS NAS ANÁLISES FILOGENÉTICAS

Liquen	Fotobionte^b	GenBank^a	Referência
<i>Anzina carneonivea</i>	<i>A. phycobiontica</i>	AF345374	Piercey-Normore and DePriest, 2001
<i>C. bellidiflora</i>	<i>Asterochloris</i> sp.	AF345413	Piercey-Normore and DePriest, 2001
<i>C. botrytes</i> MN137	<i>Asterochloris</i> sp.	AF345377	Piercey-Normore and DePriest, 2001
<i>C. caroliniana</i>	<i>Asterochloris</i> sp.	AF345395	Piercey-Normore and DePriest, 2001
<i>C. ceratophylla</i> 136	<i>Asterochloris</i> sp.(cultura)	XXXXXX	Presente trabalho
<i>C. ceratophylla</i> 136	<i>Asterochloris</i> sp.	XXXXXX	Presente trabalho
<i>C. chlorophaea</i>	<i>Asterochloris</i> sp.	AF345431	Piercey-Normore and DePriest, 2001
<i>C. crinita</i>	<i>Asterochloris</i> sp.(cultura)	AY842277	Presente trabalho
<i>C. crispata</i>	<i>Asterochloris</i> sp.	AF345378	Piercey-Normore and DePriest, 2001
<i>C. cristatella</i>	<i>Asterochloris</i> sp.	AF345425	Piercey-Normore and DePriest, 2001
<i>C. cristatella</i>	<i>T. erici</i> (UTEX912)	AF345441	Piercey-Normore and DePriest, 2001
<i>C. cristatella</i> MN057	<i>Asterochloris</i> sp.	AF345425	Piercey-Normore and DePriest, 2001
<i>C. didyma</i>	<i>Asterochloris</i> sp.	AF345415	Piercey-Normore and DePriest, 2001
<i>C. dimorphoclada</i> RY824	<i>Asterochloris</i> sp.	AY712689	Yahr et al., 2004
<i>C. evansii</i> RY798	<i>Asterochloris</i> sp.	AY712691	Yahr et al., 2004
<i>C. evansii</i> RY838	<i>Asterochloris</i> sp.	AY712696	Yahr et al., 2004
<i>C. evansii</i> RY918	<i>Asterochloris</i> sp.	AY712692	Yahr et al., 2004
<i>C. evansii</i> RY967	<i>Asterochloris</i> sp.	AY712704	Yahr et al., 2004
<i>C. evansii</i> RY976	<i>Asterochloris</i> sp.	AY712693	Yahr et al., 2004
<i>C. farinacea</i>	<i>Asterochloris</i> sp.	AF345432	Piercey-Normore and DePriest, 2001
<i>C. fimbriata</i>	<i>Asterochloris</i> sp.	AF345434	Piercey-Normore and DePriest, 2001
<i>C. fissidens</i>	<i>Asterochloris</i> sp.(cultura)	AY842278	Presente trabalho
<i>C. grayi</i> MN158	<i>Asterochloris</i> sp.	AF345397	Piercey-Normore and DePriest, 2001
<i>C. grayi</i> MN159	<i>Asterochloris</i> sp.	AF345379	Piercey-Normore and DePriest, 2001
<i>C. grayi</i> MN163	<i>Asterochloris</i> sp.	AF345380	Piercey-Normore and DePriest, 2001
<i>C. grayii</i> MN156	<i>Asterochloris</i> sp.	AF345376	Piercey-Normore and DePriest, 2001
<i>C. grayii</i> MN165	<i>Asterochloris</i> sp.	AF345385	Piercey-Normore and DePriest, 2001
<i>C. leporina</i> RY242	<i>Asterochloris</i> sp.	AY712708	Yahr et al., 2004
<i>C. leporina</i> RY921	<i>Asterochloris</i> sp.	AY712695	Yahr et al., 2004
<i>C. ochrochlora</i>	<i>Asterochloris</i> sp.	AF345438	Piercey-Normore and DePriest, 2001
<i>C. pachycladodes</i> RY581	<i>Asterochloris</i> sp.	AY712703	Yahr et al., 2004
<i>C. pachycladodes</i> RY616	<i>Asterochloris</i> sp.	AY712711	Yahr et al., 2004
<i>C. pachycladodes</i> RY762	<i>Asterochloris</i> sp.	AY712707	Yahr et al., 2004
<i>C. pachycladodes</i> RY836	<i>Asterochloris</i> sp.	AY712706	Yahr et al., 2004
<i>C. pachycladodes</i> RY968	<i>Asterochloris</i> sp.	AY712710	Yahr et al., 2004
<i>C. parasitica</i>	<i>Asterochloris</i> sp.	AF345426	Piercey-Normore and DePriest, 2001
<i>C. perforata</i>	<i>Asterochloris</i> sp.(cultura)	AY842280	Presente trabalho
<i>C. perforata</i> RY765	<i>Asterochloris</i> sp.	AY712701	Yahr et al., 2004
<i>C. prostrata</i> RY1011	<i>Asterochloris</i> sp.	AY712705	Yahr et al., 2004
<i>C. prostrata</i> RY650	<i>Asterochloris</i> sp.	AY712709	Yahr et al., 2004
<i>C. prostrata</i> RY666	<i>Asterochloris</i> sp.	AY712702	Yahr et al., 2004
<i>C. pulviniformis</i> MN068	<i>Asterochloris</i> sp.	AF345443	Piercey-Normore and DePriest, 2001
<i>C. pyxidata</i>	<i>Asterochloris</i> sp.	AF345436	Piercey-Normore and DePriest, 2001
<i>C. rappii</i>	<i>Asterochloris</i> sp.	AF345417	Piercey-Normore and DePriest, 2001
<i>C. scabriuscula</i>	<i>Asterochloris</i> sp.	AF345424	Piercey-Normore and DePriest, 2001
<i>C. spinea</i> MN069	<i>Asterochloris</i> sp.	AF345418	Piercey-Normore and DePriest, 2001

<i>C. squamosa</i> MN193	<i>Asterochloris</i> sp.	AF345381	Piercey-Normore and DePriest, 2001
<i>C. strepsilis</i> MN150a	<i>Asterochloris</i> sp.	AF345388	Piercey-Normore and DePriest, 2001
<i>C. strepsilis</i> MN150b	<i>Asterochloris</i> sp.	AF345400	Piercey-Normore and DePriest, 2001
<i>C. strepsilis</i> MN151	<i>Asterochloris</i> sp.	AF345401	Piercey-Normore and DePriest, 2001
<i>C. subsetaceae</i> RY658	<i>Asterochloris</i> sp.	AY712688	Piercey-Normore and DePriest, 2001
<i>C. subtenius</i> RY1004	<i>Asterochloris</i> sp.	AY712699	Yahr et al., 2004
<i>C. subtenius</i> RY807	<i>Asterochloris</i> sp.	AY712694	Yahr et al., 2004
<i>C. subtenius</i> RY1010	<i>Asterochloris</i> sp.	AY712697	Yahr et al., 2004
<i>C. subtenius</i> RY911	<i>Asterochloris</i> sp.	AY712700	Yahr et al., 2004
<i>C. subtenius</i> RY941	<i>Asterochloris</i> sp.	AY712690	Yahr et al., 2004
<i>C. subtenius</i> RY999	<i>Asterochloris</i> sp.	AY712698	Yahr et al., 2004
<i>C. subulata</i>	<i>Asterochloris</i> sp.	AF345427	Piercey-Normore and DePriest, 2001
<i>C. symphycarpa</i>	<i>Asterochloris</i> sp.	AF345430	Piercey-Normore and DePriest, 2001
<i>C. túrgida</i>	<i>Asterochloris</i> sp.	AF345428	Piercey-Normore and DePriest, 2001
<i>C. variegata</i> MN075	<i>Asterochloris</i> sp.	AF345419	Piercey-Normore and DePriest, 2001
<i>C. verticillaris</i>	<i>Asterochloris</i> sp.(cultura)	AY842276	Presente trabalho
<i>C. furcata</i>	<i>Asterochloris</i> sp.	AF345429	Piercey-Normore and DePriest, 2001
<i>Cladia aggregata</i>	<i>Asterochloris</i> sp.	AF345437	Piercey-Normore and DePriest, 2001
<i>Cladia agregatta</i> 152	<i>Asterochloris</i> sp.	XXXXXXX	Presente trabalho
<i>Cladia agregatta</i> 152	<i>Asterochloris</i> sp.(cultura)	XXXXXXX	Presente trabalho
<i>Cladina confuse</i>	<i>Asterochloris</i> sp. (cultura)	AY842279	Presente trabalho
<i>Cladonia</i> sp.	<i>T. magna</i> (UTEX67)	AF345423	Piercey-Normore and DePriest, 2001
<i>Cladonia</i> sp. (137)	<i>Asterochloris</i> sp.	XXXXXXX	Presente trabalho
<i>Cladonia</i> sp. 142	<i>Asterochloris</i> sp.	XXXXXXX	Presente trabalho
<i>Cladonia</i> sp. 151	<i>Asterochloris</i> sp.	XXXXXXX	Presente trabalho
<i>Cladonia</i> sp. R143	<i>Asterochloris</i> sp.	XXXXXXX	Presente trabalho
<i>Cladonia</i> sp. R146	<i>Asterochloris</i> sp.	XXXXXXX	Presente trabalho
<i>Cladonia</i> sp. R149	<i>Asterochloris</i> sp.	XXXXXXX	Presente trabalho
<i>Cladonia</i> sp. R153	<i>Asterochloris</i> sp.	XXXXXXX	Presente trabalho
<i>Cladonia</i> sp. R154	<i>Asterochloris</i> sp.	XXXXXXX	Presente trabalho
<i>Stereocaulon dactylophyllum</i>	<i>Asterochloris</i> sp.	AF345442	Piercey-Normore and DePriest, 2001
<i>Stereocaulon dactylophyllum</i>	<i>T. excentrica</i> (UTEX1714)	AF345433	Piercey-Normore and DePriest, 2001
<i>Stereocaulon pileatum</i>	<i>T. glomerata</i> (UTEX897)	AF345405	Piercey-Normore and DePriest, 2001
<i>Stereocaulon pileatum</i>	<i>T. pyriformis</i> (UTEX1713)	AF345407	Piercey-Normore and DePriest, 2001
<i>Stereocaulon</i> sp.	<i>T. irregularis</i> (UTEX2236)	AF345411	Piercey-Normore and DePriest, 2001
<i>Alectoria ochroleuca</i> CM 6	<i>Trebouxia</i> sp.	XXXXXXX	Presente trabalho
<i>Alectoria ochroleuca</i> PAr 5	<i>Trebouxia</i> sp.	XXXXXXX	Presente trabalho
<i>Anaptychia ciliaris</i>	<i>T. arboricola</i>	AF389914	Dahlkild et al., 2001
<i>Anaptychia ciliaris</i>	<i>T. arboricola</i>	AF389916	Dahlkild et al., 2001
<i>Anaptychia runcinata</i>	<i>Trebouxia</i> sp.	AJ293781	Helms et al., 2001
<i>Buellia georgei</i>	<i>Trebouxia</i> sp.	AJ293783	Helms et al., 2001
<i>Buellia straminea</i>	<i>T. higginsiae</i> (UTEX 2232)	AJ249574	Friedl et al., 2000
<i>Caloplaca cerina</i>	<i>T. gigantea</i> (UTEX2231)	AJ249577	Friedl et al., 2000
<i>Cetraria aculeata</i> PA	<i>Trebouxia</i> sp.	XXXXXXX	Presente trabalho
<i>Cetraria islandica</i> PA 2	<i>Trebouxia</i> sp.	XXXXXXX	Presente trabalho
<i>Diploschistes albescens</i>	<i>T. asymmetrica</i> (UTEX 2507)	AF345889	Piercey-Normore & DePriest, 2001
<i>Diploschistes diacapsis</i>	<i>T. asymmetrica</i> (SAG 4888)	AJ249565	Friedl et al., 2000
<i>Flavocetraria nivalis</i> PA 1	<i>Trebouxia</i> sp.	XXXXXXX	Presente trabalho
<i>Flavoparmelia caperata</i>	<i>Trebouxia gelationosa</i> .	AJ249568	Friedl et al., 2000
<i>Flavoparmelia caperata</i>	<i>Trebouxia gelationosa</i> .	AJ249569	Friedl et al., 2000
<i>Flavoparmelia subrudecta</i>	<i>T. gelatinosa</i>	AJ249575	Friedl et al., 2000

<i>Heterodermia cesarettiana</i> (8)	<i>Trebouxia</i> sp.	XXXXXXXX	Presente trabalho
<i>Heterodermia corallophora</i> (11)	<i>Trebouxia</i> sp.	XXXXXXXX	Presente trabalho
<i>Heterodermia flabelata</i> (39)	<i>Trebouxia</i> sp.	XXXXXXXX	Presente trabalho
<i>Heterodermia flabelata</i> (40)	<i>Trebouxia</i> sp.	XXXXXXXX	Presente trabalho
<i>Heterodermia flabellata</i> (7)	<i>Trebouxia</i> sp.	XXXXXXXX	Presente trabalho
<i>Heterodermia obscurata</i> (37)	<i>Trebouxia</i> sp.	XXXXXXXX	Presente trabalho
<i>Heterodermia obscurata</i> (38)	<i>Trebouxia</i> sp.	XXXXXXXX	Presente trabalho
<i>Heterodermia obscurata</i> (6)	<i>Trebouxia</i> sp.	XXXXXXXX	Presente trabalho
<i>Heterodermia</i> sp. (18)	<i>Trebouxia</i> sp.	XXXXXXXX	Presente trabalho
<i>Heterodermia</i> sp. (10)	<i>Trebouxia</i> sp.	XXXXXXXX	Presente trabalho
<i>Heterodermia</i> sp. (16)	<i>Trebouxia</i> sp.	XXXXXXXX	Presente trabalho
<i>Heterodermia</i> sp. (19)	<i>Trebouxia</i> sp.	XXXXXXXX	Presente trabalho
<i>Heterodermia</i> sp. (23)	<i>Trebouxia</i> sp.	XXXXXXXX	Presente trabalho
<i>Heterodermia</i> sp. (24)	<i>Trebouxia</i> sp.	XXXXXXXX	Presente trabalho
<i>Heterodermia</i> sp. (3)	<i>Trebouxia</i> sp.	XXXXXXXX	Presente trabalho
<i>Heterodermia</i> sp. (31)	<i>Trebouxia</i> sp.	XXXXXXXX	Presente trabalho
<i>Heterodermia</i> sp. (31)	<i>Trebouxia</i> sp.	XXXXXXXX	Presente trabalho
<i>Heterodermia</i> sp. (33)	<i>Trebouxia</i> sp.	XXXXXXXX	Presente trabalho
<i>Heterodermia</i> sp. (36)	<i>Trebouxia</i> sp.	XXXXXXXX	Presente trabalho
<i>Heterodermia vulgaris</i> . (9)	<i>Trebouxia</i> sp.	XXXXXXXX	Presente trabalho
<i>Hypogymnia physodes</i>	<i>T. simplex</i> (Hp-MT1)	AJ511357	Helms, comunicação pessoal.
<i>Hypotrachyna</i> sp. (20)	<i>Trebouxia</i> sp.	XXXXXXXX	Presente trabalho
<i>Imshaugia placorodia</i>	<i>Trebouxia jamesii</i> .	AJ249571	Fiedl et al., 2000
<i>Lecanora dispersa</i>	<i>T. incrustata</i> (UTEX784)	AJ293795	Helms et al., 2001
<i>Lecanora hageni</i>	<i>T. showmannii</i> (UTEX2234)	AF242470	Kroken and Taylor, 2000
<i>Lecanora rubina</i>	<i>T. potteri</i> (UTEX900)	AF242469	Kroken and Taylor, 2000
<i>Lecidela silaceae</i>	<i>Trebouxia</i> sp.	XXXXXX	Helms, comunicação pessoal.
<i>Letharia barbata</i>	<i>Trebouxia jamesii</i> “letharii”	AF242464	Kroken and Taylor, 2000
<i>Letharia gracilis</i>	<i>Trebouxia jamesii</i> “letharii”	AF242460	Kroken and Taylor, 2000
<i>Letharia lúcida</i>	<i>Trebouxia jamesii</i> “letharii”	AF242463	Kroken and Taylor, 2000
<i>Letharia lupina</i>	<i>Trebouxia jamesii</i> “letharii”	AF242461	Kroken and Taylor, 2000
<i>Letharia rugosa</i>	<i>Trebouxia jamesii</i> “letharii”	AF242462	Kroken and Taylor, 2000
<i>Letharia vulpina</i>	<i>T. simplex</i>	AF242457	Kroken and Taylor, 2000
<i>Melanelia glabra</i>	<i>T. simplex</i>	AJ249576	Fiedl et al., 2000
Não encontrado	<i>T jamesii</i> (UTEX 2233)	XXXXXXXX	Helms, comunicação pessoal.
Não encontrado	<i>T simplex</i> (TW1A2)	XXXXXXXX	Helms, comunicação pessoal.
<i>Parmelia carperata</i>	<i>T gelatinosa</i> (UTEX 905)	Z68698	Battacharya et al., 1996
<i>Parmelia pulla</i> 98 003B2	<i>Trebouxia</i> sp.	AJ249572	Fiedl et al., 2000
<i>Parmelia rudecta</i>	<i>T anticipata</i> (UTEX 903)	XXXXXXXX	Helms, comunicação pessoal.
<i>Parmelia tiliaceae</i> .	<i>T. impressa</i> (KL86050)	AJ007388	Beck et al., 1998
<i>Parmelina carporrhizans</i>	<i>Trebouxia</i> sp.	AJ249570	Fiedl et al., 2000
<i>Parmotrema tinctorium</i>	<i>Trebouxia</i> sp (UBT-87.019A1)	Z68702	Battacharya et al., 1996
<i>Phaeophyscia orbicularis</i>	<i>Trebouxia impressa</i>	AF389929	Dahlkild et al., 2001
<i>Phaeophyscia orbicularis</i>	<i>Trebouxia impressa</i> .	AF389930	Dahlkild et al., 2001
<i>Physcia</i> sp. (30)	<i>Trebouxia</i> sp	XXXXXXXX	Presente trabalho
<i>Physcia adscendens</i>	<i>Trebouxia</i> sp.	AJ007383	Beck et al., 2002
<i>Physcia atrostriata</i> (4)	<i>Trebouxia</i> sp	XXXXXXXX	Presente trabalho
<i>Physcia caesia</i>	<i>Trebouxia impressa</i> .	AF389920	Dahlkild et al., 2001
<i>Physcia caesia</i>	<i>Trebouxia impressa</i> .	AF389918	Dahlkild et al., 2001
<i>Physcia caesia</i>	<i>Trebouxia impressa</i> .	AF389919	Dahlkild et al., 2001

<i>Physcia erumpens</i> (27)	<i>Trebouxia</i> sp.	XXXXXXXX	Dahlkild et al., 2001
<i>Physcia pulverulenta</i>	<i>T. flava</i> (UTEX181)	AF242467	Kroken and Taylor, 2000
<i>Physcia sinuosa</i> (1)	<i>Trebouxia</i> sp	XXXXXXXX	Dahlkild et al., 2001
<i>Physcia sinuosa</i> (13)	<i>Trebouxia</i> sp	XXXXXXXX	Presente trabalho
<i>Physcia sinuosa</i> (14)	<i>Trebouxia</i> sp	XXXXXXXX	Presente trabalho
<i>Physcia sinuosa</i> (15)	<i>Trebouxia</i> sp	XXXXXXXX	Presente trabalho
<i>Physcia</i> sp. (21)	<i>Trebouxia</i> sp	XXXXXXXX	Presente trabalho
<i>Physcia</i> sp. (22)	<i>Trebouxia</i> sp	XXXXXXXX	Presente trabalho
<i>Physcia</i> sp. (25)	<i>Trebouxia</i> sp	XXXXXXXX	Presente trabalho
<i>Physcia</i> sp. (28)	<i>Trebouxia</i> sp	XXXXXXXX	Presente trabalho
<i>Physcia</i> sp. (42)	<i>Trebouxia</i> sp	XXXXXXXX	Presente trabalho
<i>Physcia stellaris</i>	<i>T. impressa</i> (UTEX 892)	AF345891	Piercey-Normore & DePriest. 2001
<i>Physcia stellaris</i>	<i>T. impressa</i> (UTEX 893)	AF345890	Piercey-Normore & DePriest. 2001
<i>Physcia tenella</i>	<i>Trebouxia impressa</i>	AF389935	Dahlkild et al., 2001
<i>Physcia tenella</i>	<i>Trebouxia impressa</i>	AF389937	Dahlkild et al., 2001
<i>Physciaceae</i> (12)	<i>Trebouxia</i> sp	XXXXXXXX	Presente trabalho
<i>Physciaceae</i> (17)	<i>Trebouxia</i> sp	XXXXXXXX	Presente trabalho
<i>Physconia distorta</i>	<i>Trebouxia impressa</i>	AF389924	Dahlkild et al., 2001
<i>Physconia distorta</i>	<i>Trebouxia impressa</i>	AF389927	Dahlkild et al., 2001
<i>Physconia distorta</i>	<i>Trebouxia impressa</i>	AF389923	Dahlkild et al., 2001
<i>Pseudevernia furfuracea</i> SK	<i>T. simplex</i>	AF242459	Kroken and Taylor, 2000
<i>Pseudevernia cladoniae</i>	<i>Trebouxia jamesii.</i>	AF242466	Kroken and Taylor, 2000
<i>Pseudevernia consocians</i>	<i>Trebouxia jamesii.</i>	AF242458	Kroken and Taylor, 2000
<i>Pseudevernia furfuracea</i>	<i>Trebouxia jamesii.</i>	AF242459	Kroken and Taylor, 2000
<i>Punctelia subrudecta</i>	<i>T. arboricola</i> (UBT 92 001C5)	AJ249564	Fiedl et al., 2000
<i>Pyxine</i> sp. (5)	<i>Trebouxia</i> sp	XXXXXXXX	Presente trabalho
<i>Ramalina anceps</i> (70)	<i>Trebouxia</i> sp.	AY842269	Presente trabalho
<i>Ramalina anceps</i> (78)	<i>Trebouxia</i> sp.	AY842268	Presente trabalho
<i>Ramalina celastri</i> (74)	<i>Trebouxia</i> sp	XXXXXXXX	Presente trabalho
<i>Ramalina complanata</i>	<i>Trebouxia</i> sp. (culture)	AY842262	Presente trabalho
<i>Ramalina dendroides</i> (79)	<i>Trebouxia</i> sp.	AY842267	Presente trabalho
<i>Ramalina farinacea</i> (FB22)	<i>Trebouxia</i> sp.	AY842264	Presente trabalho
<i>Ramalina fraxineae</i> (FB30)	<i>Trebouxia</i> sp.	AY842265	Presente trabalho
<i>Ramalina gracilis</i>	<i>Trebouxia</i> sp. (culture)	AY842263	Presente trabalho
<i>Ramalina gracilis</i> (63)	<i>Trebouxia</i> sp.	AY842273	Presente trabalho
<i>Ramalina peruviana</i> (58)	<i>Trebouxia</i> sp.	AY842270	Presente trabalho
<i>Ramalina peruviana</i> (67)	<i>Trebouxia</i> sp.(culture)	AY842266	Presente trabalho
<i>Ramalina peruviana</i> (81)	<i>Trebouxia</i> sp.	AY842275	Presente trabalho
<i>Ramalina pusiola</i> (75)	<i>Trebouxia</i> sp	XXXXXXXX	Presente trabalho
<i>Ramalina sorediosa</i> (59)	<i>Trebouxia</i> sp.	AY842272	Presente trabalho
<i>Ramalina sorediosa</i> (60)	<i>Trebouxia</i> sp.	AY842271	Presente trabalho
<i>Ramalina sorediosa</i> (61)	<i>Trebouxia</i> sp	XXXXXXXX	Presente trabalho
<i>Ramalina</i> sp.	<i>T. galapagensis</i> (UTEX2230)	AJ249567	Fiedl et al., 2000
<i>Ramalina</i> sp. (65)	<i>Trebouxia</i> sp	XXXXXXXX	Presente trabalho
<i>Ramalina</i> sp. (66)	<i>Trebouxia</i> sp	XXXXXXXX	Presente trabalho
<i>Ramalina</i> sp. (69)	<i>Trebouxia</i> sp.	XXXXXXXX	Presente trabalho
<i>Ramalina</i> sp. (71)	<i>Trebouxia</i> sp	XXXXXXXX	Presente trabalho
<i>Ramalina</i> sp. (76)	<i>Trebouxia</i> sp	XXXXXXXX	Presente trabalho
<i>Ramalina</i> sp. (77)	<i>Trebouxia</i> sp	XXXXXXXX	Presente trabalho
<i>Ramalina sprengelii</i> (68)	<i>Trebouxia</i> sp.	AY842274	Presente trabalho
<i>Teloschistes exilis</i> (53)	<i>Trebouxia</i> sp	XXXXXXXX	Presente trabalho

<i>Teloschistes exilis</i> (54)	<i>Trebouxia</i> sp	XXXXXXXX	Presente trabalho
<i>Teloschistes exilis</i> (55)	<i>Trebouxia</i> sp	XXXXXXXX	Presente trabalho
<i>Teloschistes exilis</i> (56)	<i>Trebouxia</i> sp	XXXXXXXX	Presente trabalho
<i>Teloschistes flavicans</i>	<i>Trebouxia</i> sp (culture)	XXXXXXXX	Presente trabalho
<i>Teloschistes flavicans</i> (46)	<i>Trebouxia</i> sp	XXXXXXXX	Presente trabalho
<i>Teloschistes flavicans</i> (47)	<i>Trebouxia</i> sp	XXXXXXXX	Presente trabalho
<i>Teloschistes flavicans</i> (48)	<i>Trebouxia</i> sp	XXXXXXXX	Presente trabalho
<i>Teloschistes flavicans</i> (49)	<i>Trebouxia</i> sp	XXXXXXXX	Presente trabalho
<i>Teloschistes flavicans</i> (50)	<i>Trebouxia</i> sp	XXXXXXXX	Presente trabalho
<i>Teloschistes flavicans</i> (51)	<i>Trebouxia</i> sp	XXXXXXXX	Presente trabalho
<i>Teloschistes flavicans</i> (51b)	<i>Trebouxia</i> sp	XXXXXXXX	Presente trabalho
<i>Teloschistes flavicans</i> (52)	<i>Trebouxia</i> sp	XXXXXXXX	Presente trabalho
<i>Umbilicaria Antarctica</i>	<i>Trebouxia</i> sp.	AJ315855	Romeike et al., 2002
<i>Umbilicaria Antarctica</i>	<i>Trebouxia</i> sp.	AJ431580	Romeike et al., 2002
<i>Umbilicaria Antarctica</i>	<i>Trebouxia</i> sp.	AJ431591	Romeike et al., 2002
<i>Umbilicaria Antarctica</i>	<i>Trebouxia</i> sp.	AJ431580	Romeike et al., 2002
<i>Umbilicaria decussata</i>	<i>Trebouxia</i> sp.	AJ431584	Romeike et al., 2002
<i>Umbilicaria decussata</i>	<i>Trebouxia</i> sp.	AJ431583	Romeike et al., 2002
<i>Umbilicaria decussata</i>	<i>Trebouxia</i> sp.	AJ431583	Romeike et al., 2002
<i>Umbilicaria kappenii</i>	<i>Trebouxia</i> sp.	AJ318780	Romeike et al., 2002
<i>Umbilicaria kappenii</i>	<i>Trebouxia</i> sp.	AJ315854	Romeike et al., 2002
<i>Umbilicaria umbilicarioides</i>	<i>Trebouxia</i> sp.	AJ431587	Romeike et al., 2002
<i>Umbilicaria. Antarctica</i>	<i>Trebouxia simplex.</i>	AJ431575	Romeike et al., 2002
<i>Usnea arizonica</i>	<i>Trebouxia</i> sp.	AF242471	Kroken and Taylor, 2000
<i>Usnea filipendula</i>	<i>T. usneae</i> (UTEX2235)	AJ249573	Friedl et al., 2000
<i>Usnea</i> sp. (101)	<i>Trebouxia</i> sp	XXXXXXXX	Presente trabalho
<i>Usnea</i> sp. (102)	<i>Trebouxia</i> sp	XXXXXXXX	Presente trabalho
<i>Usnea</i> sp. (103)	<i>Trebouxia</i> sp	XXXXXXXX	Presente trabalho
Vida livre	<i>T. arboricola</i> (SAG 2191 ^a)	Z68705	Battacharya et al., 1996
Vida Livre	<i>T. corticola</i> (UTEX 909)	AJ249566	Friedl et al., 2000
<i>Xanthoria parietina</i>	<i>T aggregata</i> (UTEX 180)	XXXXXXXX	Helms, comunicação pessoal.
<i>Xanthoria parietina</i>	<i>T decolorans</i> (UTEX 901)	XXXXXXXX	Helms, comunicação pessoal.

^a Número de acesso das seqüências ITS rDNA.

^b Linhagens das culturas entre parênteses.

1.3.3. Análise dos Dados

As seqüências ITS rDNA obtidas neste estudo foram alinhadas com seqüências de *Trebouxia* e *Asterochloris*-ITS disponíveis no GenBank: (Tabela 1.5.) (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/blast>) usando o software Clustal W incluído no editor de seqüências BioEdit (HALL., 1999). Após análise do Clustal W, o alinhamento foi aprimorado manualmente.

As hipóteses filogenéticas para as espécies de *Trebouxia* e *Asterochloris* foram construídas utilizando dois métodos: probabilidade posterior através do uso do software MrBayes e Máxima Parcimônia, através do uso do software PAUP.

A análise Bayesiana foi implementada pelo programa MrBayes (HUELSENBECK & RONQUIST, 2001). Os modelos de substituição de nucleotídeos (GTR+G: *Trebouxia* Tree; K80+G: “*Asterochloris*” tree) foram selecionados utilizando o teste de “likelihood ratio” (HUELSENBECK & CRANDALL, 1997) com o programa MrModelTest (Nylander, 2002). Para outros parâmetros as configurações padrões foram utilizadas. A análise de “*Markov Chain Monte Carlo* (MCMC)” foi efetuada com 2.000.000 árvores geradas, com a análise iniciada a partir de uma árvore aleatória. A análise foi repetida 5 vezes para verificar se a hipótese obtida era estável. Para cada análise, uma árvore foi aleatoriamente amostrada, sendo que as primeiras 50.000 árvores foram descartadas. Todas as árvores de cada análise foram reunidas em um arquivo, posteriormente um filograma (árvore) consenso foi calculado, sendo que a distância dos ramos foi determinada utilizando o comando *sumt* no MrBayes.

A análise de Máxima Parcimônia foi implementada pelo software PAUP, versão 4.0 beta 10. Os valores de “bootstrap” (valor de suporte - confiabilidade) foram obtidos através da análise de 10.000 replicações.

Árvores filogenéticas para ambos os métodos foram desenhadas com o software Treeview (PAGE, 1996). Valores de suporte acima de 90 % podem ser admitidos como confiáveis para comprovação das hipóteses evolutivas.

1.4. Resultados e discussão

Duzentos e doze (212) líquens tiveram seu DNA extraído e foram submetidos à análise de suas regiões ITS rDNA. Destas, 91 seqüências foram obtidas, o que corresponde a 44% das amostras testadas. Estas seqüências foram comparadas com seqüências já existentes no GenBank e as hipóteses evolutivas das espécies *Trebouxia* e *Asterochloris* foram testadas.

Embora o atual grupo de fotobiontes a que corresponde o gênero *Asterochloris* ainda não tenha sido descrito, é consenso entre os especialistas que este representa um gênero distinto de *Trebouxia* (RAMBOLD et al., 1997, YAHR et al., 2004), desta maneira, neste trabalho *Trebouxia* e *Asterochloris* serão assumidos como dois gêneros distintos, e as hipóteses evolutivas para estes gêneros tratadas de maneira individual.

1.4.1. *Asterochloris*

Dos 212 líquens que tiveram seu DNA extraído, 45 pertencem ao grupo das Cladoniaceae (incluindo uma amostra do gênero *Stereocaulon*). Destes foram obtidos nove seqüências diretamente do líquen. Outras sete seqüências foram obtidas através de culturas dos fotobiontes isolados:

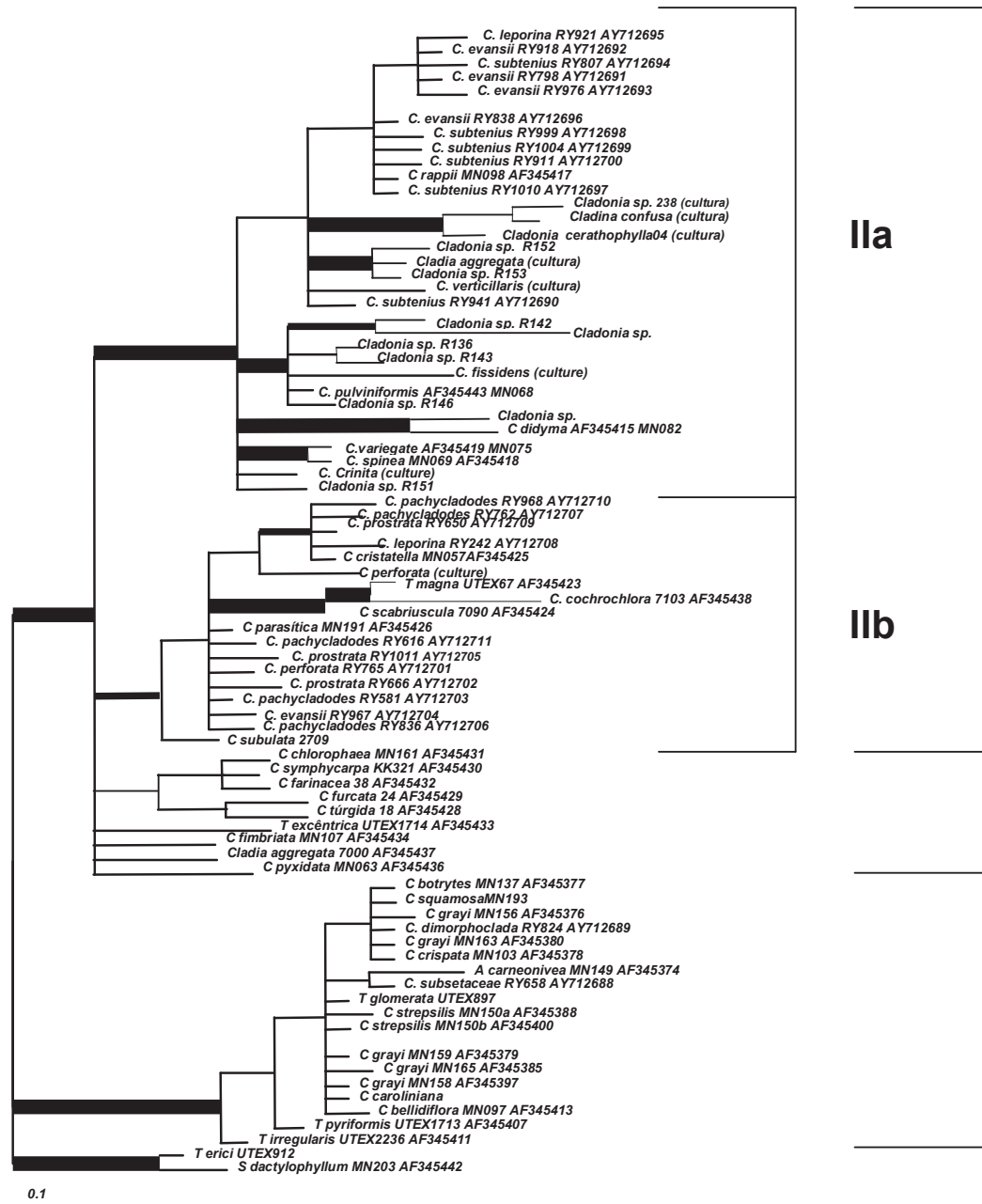
- *Cladina confusa*: gentilmente cedida pela Dra. Lucimara Cordeiro da Unioeste (Cascavel, PR – Brasil)
- *C. crinita*; *C. fissidens*; *C. verticillaris*: gentilmente cedida pela Dra. Elfriede Stöcker-Wörgötter (Universidade de Salzburg, Salzburg – Áustria).
- *Cladia aggregata*; *Cladonia ceratophylla*; *Cladonia* 137: obtidas através de isolamento, conforme descrito no Capítulo 2.

As 16 seqüências obtidas para o gênero *Asterochloris* foram alinhadas com outras 62 seqüências obtidas no GenBank. A tabela 1.5. apresenta todas as seqüências utilizadas na construção da hipótese evolutiva de *Asterochloris*, com suas respectivas referências e números de acesso no GenBank.

A árvore filogenética obtida com este trabalho para o gênero *Asterochloris*, (figura 1.6.), apresenta a mesma topologia daquela encontrada por PIERCEY-NORMORE & DEPRIEST (2001) e YAHR et al. (2004). A árvore apresenta dois Clados principais bem suportados Clado I e Clado II, ambos com 100 % de suporte.

FIGURA 1.6: ÁRVORE CONSENSO PARA O GÊNERO *Asterochloris* OBTIDA ATRAVÉS DE ANÁLISE BAYESIANA.

— < 90 %, — 90-94 %, — 95-100 %.



A árvore obtida apresenta uma série de ramos não resolvidos, o que pode ser explicado por uma alta similaridade entre as seqüências. Segundo PIERCEY-NORMORE & DEPRIEST (2001), as seqüências ITS rDNA de *Asterochloris* apresentaram uma alta similaridade entre si, sendo esta similaridade, em geral, maior de 90%. Assim, podemos afirmar que, como o resultado obtido por PIERCEY-NORMORE & DEPRIEST (2001), nossa baixa resolução em vários ramos da árvore filogenética, pode ser justificada por uma alta similaridade entre as seqüências.

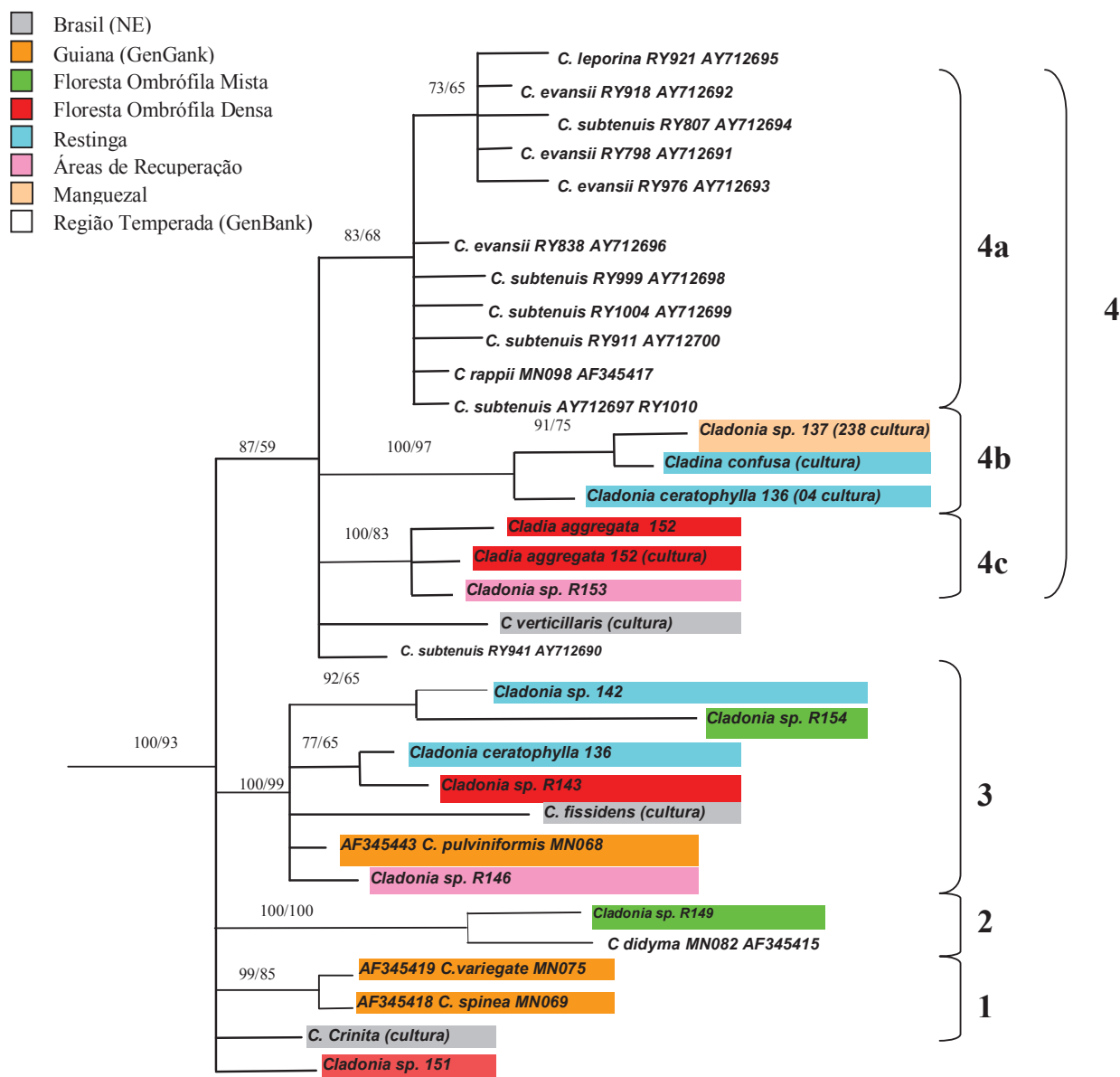
O Clado I é altamente suportado (100%) e apresenta-se constituído somente de fotobiontes de líquens de regiões não tropicais. Neste clado são observadas algumas das linhagens UTEX, como as linhagens *Trebouxia (Asterochloris) irregularis* UTEX 2238, *Trebouxia (Asterochloris) pyriformis* UTEX 1713 e *Trebouxia (Asterochloris) glomerata* UTEX 897. As linhagens UTEX representam as espécies hoje conhecidas para *Trebouxia* (ainda não dividida em *Trebouxia* e *Asterochloris*). Neste clado encontramos ainda o fotobionte de *Anzina carneonivea*, o qual foi a primeira descrição para o gênero *Asterochloris* (TSCHERMAK-WOESS, 1980).

O Clado II apresenta 89% de suporte e é dividido em dois subclados bem suportados, Subclado IIa, com 93% de suporte e Subclado IIb, 100% suportado. Segundo YAHR e colaboradores (2004), a maior diversidade de linhagens ITS rDNA é encontrada neste Clado II. Além destes dois subclados, ramos menores são encontrados no subclado II, porém estes apresentam uma baixa amostragem e resolução.

Subclado IIb (93% de suporte) é representado também por seqüências de fotobiontes de líquens de regiões temperadas, nenhuma seqüência de fotobionte de regiões tropicais foi observada nesta subclado. No Subclado IIa é observado a linhagem *Trebouxia magna* UTEX 67. A seqüência do fotobionte de *C.perforata*, (cedida pela Dra. Elfriede Stöcker-Wörgötter, coletada na Florida) também é encontrada nesta subclado. Segundo YAHR e colaboradores (2004), o Subclado IIb apresenta 11 genótipos diferentes.

A hipótese evolutiva de *Asterochloris* apresentou que todas as amostras de fotobiontes de líquens de regiões tropicais estão acondicionadas no Subclado IIa. Este subclado, 100% suportado, está detalhado na figura 1.7. O Subclado IIa apresenta 4 linhagens principais 1,2,3 e 4, sendo que as três primeiras apresentam um alto suporte estatístico (100%).

FIGURA 1.7: DETALHE DA SUBCLADO IIA DA ÁRVORE FILOGENÉTICA DO GÊNERO *Asterochloris*. OS VALORES DE SUPORTE INDICAM PROBABILIDADE POSTERIOR (BAYESIANA) E PARCIMÔNIA, RESPECTIVAMENTE



As linhagens 1 e 3 apresentam somente fotobiontes de líquens coletados em regiões tropicais, seja no Brasil ou na Guiana (PIERCE-NORMORE & DEPRIEST, 2001). Em contrapartida a linhagem 2 apresenta a amostra *C. didyma* MN082, a qual foi coletada no nordeste (NE) dos Estados Unidos da América (EUA) (PIERCE-NORMORE & DEPRIEST, 2001).

A linhagem 4 apresenta um ramo (4a) quase que exclusivo de amostras da Flórida, EUA, exceto pela amostra *C. rappii* MN098, também proveniente do NE dos EUA (PIERCEY-NORMORE & DEPRIEST, 2001). Os outros ramos presentes na linhagem 4 (4b e 4c) apresentam um suporte de 100% e são representados somente por amostras do Brasil.

YAHR e colaboradores (2004), analisando amostras de líquens do gênero *Cladonia* em diversos pontos de coleta na Florida (EUA), observaram a presença de fotobiontes representantes das três subclados da árvore evolutiva de *Asterochloris* (I, IIa e IIb) em todos os pontos de coleta, ou seja, não é observada especificidade de amostras do Subclado IIa por um sítio específico de coleta, que poderia, por exemplo, apresentar um clima próximo do tropical.

Entretanto as análises demonstraram que, embora o Subclado IIa não apresente somente amostras tropicais, todas as amostras tropicais são pertencentes a esta subclado. Outro ponto interessante a ser observado é que as duas amostras coletadas no NE dos EUA representam líquens (*C. dydima* e *C. rappii*) com uma distribuição que percorre toda a costa leste dos EUA, América Central, podendo até mesmo atingir o Brasil (BRODO et al., 2001). Embora alguns estudos de co-evolução (PIERCE-NORMORE & DEPRIEST, 2001) e especificidade “micobionte x fotobionte” tenham sido realizados (YAHR et al., 2004) para a família Cladoniaceae, estes estudos não abordaram estas duas taxa especificamente. Portanto, não é descartada a hipótese de que estes micobiontes apresentem uma alta especificidade pelos fotobiontes, o que permitiria a distribuição do fotobionte em regiões não tropicais.

Sendo assim pode-se concluir que embora tenham sido obtidas apenas 12 seqüências ITS rDNA para a família Cladoniaceae, estas estão posicionadas em um mesmo clado na hipótese evolutiva de *Asterochloris*, juntamente com outros líquens de ambientes tropicais. Isto sugere que existe uma “Linhagem Tropical” para *Asterochloris*, entretanto,

mais amostras de regiões tropicais, especialmente da América Central são necessárias para que se possa afirmar com certeza esses resultados.

1.4.2. *Trebouxia*

As análises filogenéticas das regiões ITS rDNA de fotobiontes de líquens coletados no litoral do Paraná, juntamente com os dados provenientes do GenBank (totalizando 130 seqüências, sendo 68 do GenBank – Tabela 1.5), apresentou como resultado uma árvore filogenética contendo 4 grandes Clados (Figura 1.8).

Este resultado confirma os dados anteriormente apresentados por outros autores (KROKEN & TAYLOR, 2000; HELMS, 2003). Friedl e colaboradores (2000) haviam observado a presença de 5 linhagens principais, nomeadas por HELMS e colaboradores (2001) em Clados I, II, III, IV e V, sendo que os Clados II e III apresentavam-se intimamente relacionadas entre si. Posteriormente HELMS (2003) nomeou esses Clados de acordo com as espécies presentes em cada Clado. O Clado I foi nomeado **Clado A**, por apresentar a linhagem *T. arboricola* SAG219-1a. Os Clados II e III (HELMS et al., 2001) foram reunidos no **Clado I**, devido a presença da linhagem *T. impressa* UTEX 839. O Clado IV foi alterada para **Clado G**, de *T. galapagensis* UTEX 2230. Finalmente o Clado V teve seu nome modificado para **Clado S**, pela presença da linhagem *T. simplex* TW1A-2 (BECK, 2002). Neste trabalho seguiremos a classificação e nomenclatura proposta por HELMS (2003), utilizando quatro grande Clados bem suportadas (Figura 1.8).

O bem suportado (100 %) Clado G é representada pelas linhagens *T. galapagensis* UTEX 2230, *T. higginsiae* UTEX 2232, *T. corticola* UTEX 909 e *T. usneae* UTEX 2235. Neste Clado estão presentes a maioria das seqüências de fotobiontes de líquens tropicais. Na realidade, exceto pelas amostras *T. corticola* UTEX 909 e *T. usneae* UTEX 2235 esta poderia ser considerado Clado exclusivo de amostras tropicais. Este fato corrobora os dados encontrados por HELMS (2003), que nomina o Clado G como o “Clado Tropical” na filogenia de *Trebouxia*. O Clado G apresenta 9 subclados bem suportados. A descrição e padrões de cada subclado serão discutidos a seguir (figura 1.9).

FIGURA 1.8: ÁRVORE CONSENSO PARA O GÊNERO *TREBOUXIA*. A ÁRVORE FOI CONTRUÍDA ATRAVÉS DE ANÁLISE BAYESIANA E PARCIMÔNIA. O CLADO A FOI UTILIZADO COMO RAIZ DA ÁRVORE.

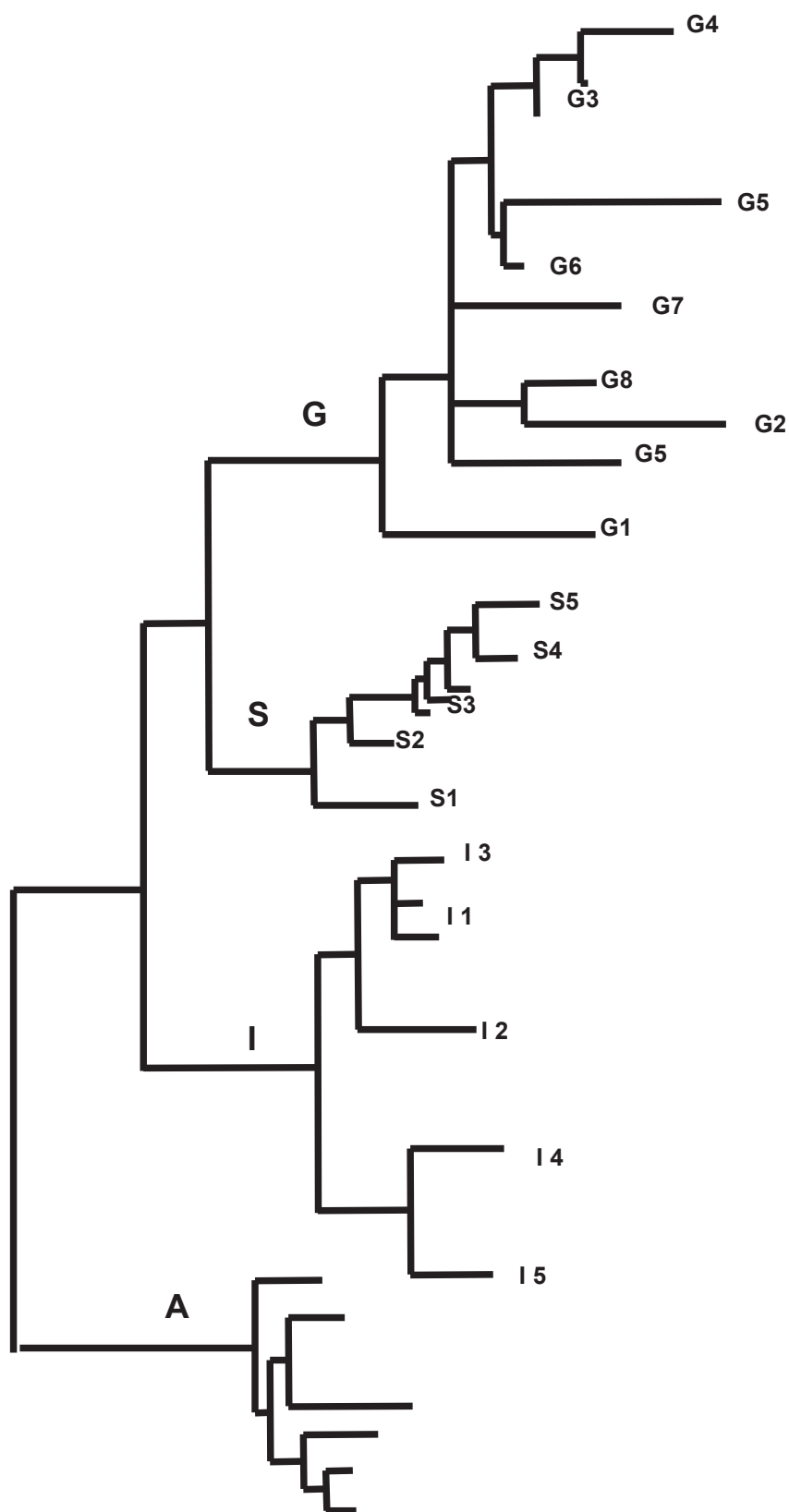
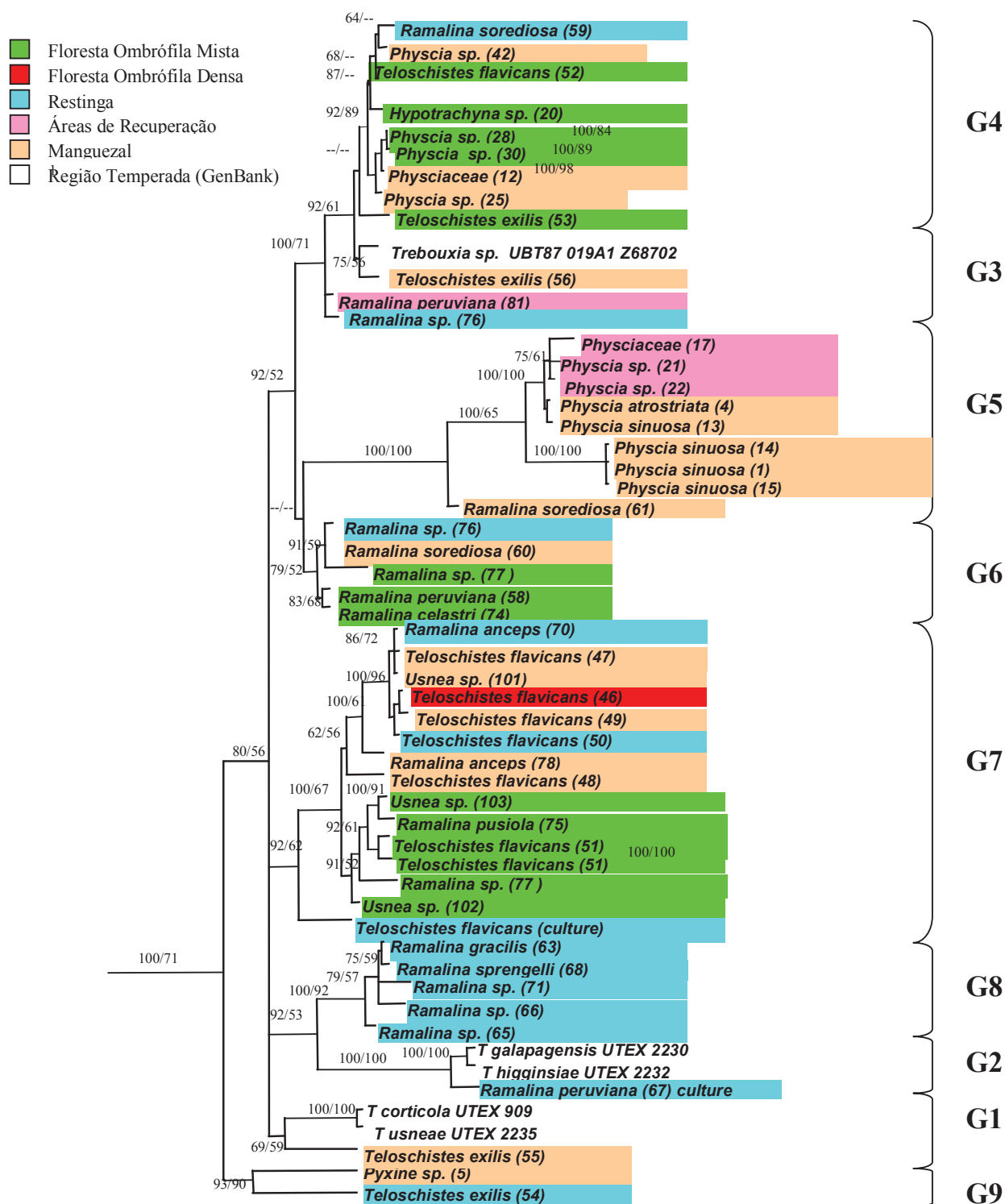


FIGURA 1.9: DETALHE DO CLADO G, DA ÁRVORE FILOGENÉTICA DO GÊNERO *Trebouxia*. . OS VALORES DE SUPORTE INDICAM PROBABILIDADE POSTERIOR (BAYESIANA) E PARCIMÔNIA, RESPECTIVAMENTE



A nomenclatura dos Subclados seguiu os padrões utilizados na taxonomia, ou seja, o mais antigo foi numerado primeiramente e assim por diante. Desta maneira o subclado contendo a linhagem *T. corticola* UTEX 909 foi denominado G1. A linhagem *T. usneae* UTEX 2235 também pertence a este subclado. Segundo HELMS e colaboradores (2001) estas duas linhagens, descritas como espécies diferentes apresentam a mesma sequência ITS rDNA. Dentro do Clado G esses dois fotobiontes são os únicos provenientes de regiões temperadas, sendo provenientes do Estado do Maine – EUA. Entretanto a exata localização do subclado G1 dentro do Clado G não é bem esclarecida, uma vez que todos os “nós” (ancestrais) que se apresentam relacionados com essas sequências não são bem suportados. Apenas a amostra *Teloschistes exilis* (55) apresenta-se como um representante desta subclado, embora sua presença não seja suportada.

No Subclado G2, 100 % de suporte, são observadas as linhagens *T. galapagensis* UTEX 2230 e *T. higginsiae* UTEX 2232, as quais são provenientes das Ilhas Galápagos (Floreana e Bartolomeu, respectivamente) – Equador (HILDRETH & AHMADJIAN, 1981). Da mesma maneira que para as linhagens anteriormente citadas, estas espécies apresentariam a mesma sequência ITS (HELMS et al., 2001). Entretanto, na análise utilizando os dados depositados no GenBank observou-se que na sequência de *T. higginsiae* existe um “gap” de 45 nucleotídeos em relação a *T. galapagensis*, sendo o resto da sequência idêntica. Observou-se ainda nesta clado a presença do fotobionte do líquen *Ramalina peruviana* (67), o qual apresenta uma origem monofilética com as linhagens UTEX.

O Subclado G2 apresenta uma origem monofilética bem suportada (93%) com o Subclado G8, o qual é constituído somente por amostras de *Ramalina* coletadas na Ilha do Mel (Paraná - Brasil), em uma vegetação de restinga. Um interessante ponto a ser observado é que a espécie de *R. peruviana* (67), presente no subclado G2, também é originada do mesmo ponto de coleta. Além disso, *T. galapagensis* UTEX 2230 foi isolada de uma espécie de *Ramalina* coletada na Ilha Floreana, (Ilhas Galápagos – Equador) (HILDRET & AHMADJIAN, 1981). As outras espécies de *Ramalina* (figura 1.9) de restinga foram coletadas na Ilha Rasa, que se apresenta dentro da Baía de Guaraqueçaba – PR, onde a influência oceânica é menor (ver mapa, figura 1.4.). Desta maneira pode-se sugerir uma relação entre os fotobiontes dos Subclados G2 e G8 e os líquens do gênero *Ramalina* coletados em regiões sob influência oceânica. A única exceção neste padrão é que o

fotobionte *T. higginsiae* foi isolado de *Buelia straminea*, um líquen da família Physciaceae (HILDRET & AHMADJIAN, 1981).

O Subclado G3 apresenta a linhagem *Trebouxia* UBT 87, a qual foi primeiramente descrita, através de dados morfológicos, como *T. usneae* (FRIEDL, 1989a), entretanto em 2001 (HELMS et al., 2001) observou que esta linhagem não se apresenta filogeneticamente relacionada com a linhagem *T. usneae* UTEX 2235. As outras seqüências encontradas pertencem aos fotobiontes de *Teloschistes exilis*, *Ramalina* sp. e *R. peruviana*.

Subclado G4 apresenta uma origem monofilética com o Subclado G3, porém devido a não resolução do ramo que apresenta o fotobionte de *Teloschistes exilis* (53) fez com que fossem analisados separadamente. Este subclado apresenta um alto suporte (98%), e aparentemente não apresenta nenhum padrão de distribuição dentro deste subclado. Foram observadas amostras de diferentes pontos de coleta e famílias de líquens.

Fotobiontes de líquens da família Physciaceae são a maioria no Subclado G5, exceção feita a amostra de *R. solediosa* (61). Porém, esta amostra apresenta-se mais distante da linhagem principal presente no Subclado G5, o qual contém apenas amostras da família Physciaceae. Observamos ainda que existe um agrupamento de fotobiontes de acordo com o ambiente de coleta, sugerindo a possibilidade de uma especificidade dentro do subclado.

O Subclado G6 (suporte 93%) apresenta somente fotobiontes de líquens do gênero *Ramalina*, entretanto nenhuma especificidade por ecossistema específico é observada.

O Subclado G7, fortemente suportado (92%), é o que apresenta o maior número de espécimes. A principal característica deste subclado é que ele é exclusivamente constituído de fotobiontes de líquens com hábito fruticoso. Além disso, observa-se dentro do Subclado G7, duas linhagens distintas, uma exclusiva de fotobiontes coletados em Floresta Ombrófila Mista e outra com uma diversidade de ecossistemas (Restinga, Manguezal e Floresta Ombrófila Densa).

O menor subclado presente na Clado G é o subclado G9, o qual apresenta-se constituído de apenas 2 amostras, *Pyxine* sp. (5) e *Teloschistes exilis* (54).

Ao analisar o Clado G de uma maneira mais ampla verifica-se que se trata quase que exclusivamente de um “Clado Tropical”, além disso, alguns de seus subclados apresentam uma especificidade, seja por ambiente (G2 e G8), por grupo taxonômico (G6 e

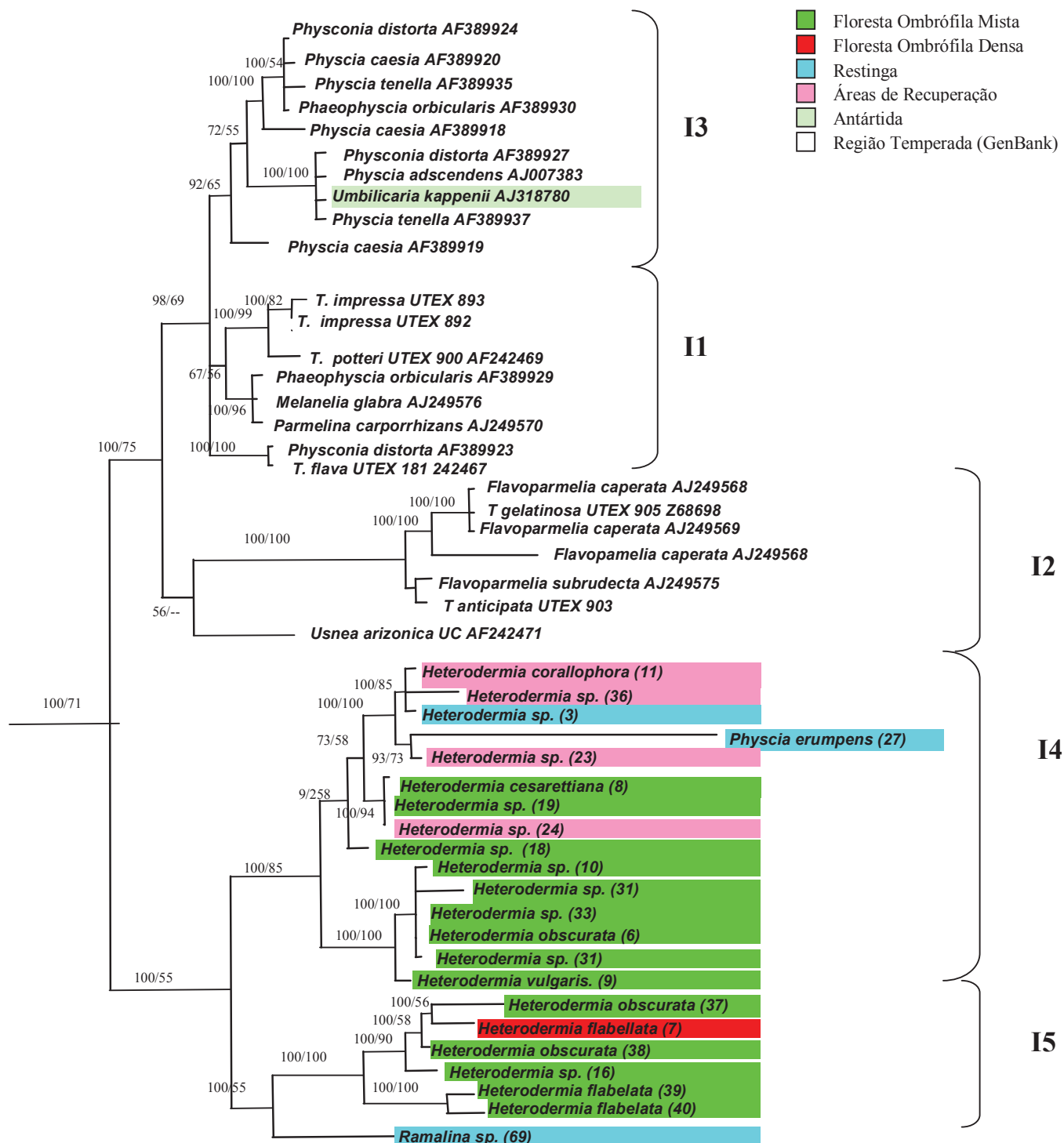
G5), ou por hábito do líquen (G7). Entretanto se faz necessário uma amostragem de outras regiões como a América Central, África e Brasil (Norte e Nordeste), no intuito de verificar-se a real amplitude de distribuição deste grupo de fotobiontes.

O Clado I (Figura 1.10.) é representado por dois grupos principais de subclados, um deles apresentando amostras de regiões temperadas e outro de regiões tropicais. Ambos apresentam um alto suporte (100%). O grupo de regiões temperadas apresenta os Subclados I1, I2 e I3. Em contrapartida o grupo tropical apresenta os Subclados I4 e I5. É importante observar que a principal família de micobiontes relacionados ao Clado I é a família Physciaceae. Este fato, além de representar uma possível especificidade pode ser explicado também pelo grande número de trabalhos envolvendo a família Physciaceae, tanto para mico- como fotobiontes (BECK et al., 1998; HELMS et al., 2001; DAHLKILD et al, 2001; HELMS et al., 2003; HELMS, 2003).

Os Subclados I1, I2 e I3, apresentam uma origem monofilética e alto suporte (> 95%), sendo que um leve padrão de distribuição pode ser observado nestes Subclados. Principalmente em I3 e I2, relacionadas principalmente com Physciaceae e Parmeliaceae respectivamente. Entretanto, chama a atenção a presença de uma amostra de *Umbilicaria kapenii* (Umbilicariaceae), proveniente da Antártida no Subclado I3. O subclado I1 apresenta as linhagens *Trebouxia impressa* UTEX 892 e UTEX 893, *T. potteri* UTEX 900 e *T. flava* UTEX 181.

As amostras tropicais de fotobiontes presentes no Clado I foram divididas em dois Subclados (I4 e I5) bem suportados e com uma origem monofilética comum. Um ponto importante a ser observado é que a grande maioria das amostras presentes é pertencente ao gênero *Heterodermia*, típico de regiões tropicais [sendo apenas 2 fotobiontes não pertencentes ao gênero *Heterodermia*: *Ramalina* sp. (69) e *Physcia erumpens* (27)], mas estas amostras encontram-se relativamente distantes das outras. Além disso, não foram observadas amostras de fotobiontes de *Heterodermia* localizados em outras regiões da árvore evolutiva da alga *Trebouxia*. Esses dados permitem sugerir uma importante especificidade de distribuição, micobionte x fotobionte, uma vez que outros gêneros de Physciaceae são preferencialmente relacionados com fotobiontes do Clado G.

FIGURA 1.10.: DETALHE DO CLADO I, DA ÁRVORE FILOGENÉTICA DO GÊNERO *Trebouxia*. . OS VALORES DE SUPORTE INDICAM PROBABILIDADE POSTERIOR (BAYESIANA) E PARCIMÔNIA, RESPECTIVAMENTE



O Clado S é característico de regiões temperadas, nele observamos a presença da linhagem *T. simplex* TW-1A2 e segundo HELMS (2003), apresenta, dentre todos os Clados de *Trebouxia*, a menor diversidade. O Clado S é caracterizado na literatura por apresentar amostras do Hemisfério Norte e Antártida (ROMEIKE et al., 2002). Porém os resultados aqui apresentados demonstram a presença de um subclado monofilético de fotobiontes de líquens coletados no Chile, Subclado S5, (Gentilmente cedidos pelo Dr. Jarle Bjerke – Universidade de Tromsø, Noruega) esse subclado (Figura 1.11.) está relacionado ao Subclado S4, que apresenta líquens originados da Antártida. A filogenia destes dois clados indica uma origem comum entre suas linhagens de fotobiontes.

Além dos Subclados apresentadas acima, outras três estão presentes. O Subclado S1 apresenta a linhagem *T. simplex* TW12A que foi utilizada por HELMS (2003) para a nomenclatura do Clado S. O Subclado S3, exclusivo de fotobiontes associados ao gênero *Letharia* (KROKEN & TAYLOR, 2000). E o Subclado parafilético S2, que apresenta outra linhagem *T. simplex*.

ROMEIKE e colaboradores (2002) observaram uma alta diversidade de “fotobiontes Antárticos” com 5 linhagens distribuídas na árvore filogenética de *Trebouxia*. O Clado que apresenta maior diversidade é o Clado A com 3 linhagens. As outras são observadas, um no Clado I e outro no Clado S. A linhagem do Clado S (Subclado S4) apresenta uma origem monofilética com Subclado S5, o qual apresenta amostras do Chile.

Clado A apresentou 100% de suporte estatístico e apresenta além da linhagem *T. arboricola* SAG219-1a, as linhagens *T. aggregata* UTEX 180, *T. arboricola* UBT 92001c5, *T. decolorans* UTEX 901, *T. jamesii* UTEX 2233, *T. asymmetrica* SAG 48 88, *T. incrustata* UTEX 784, *T. showmanii* UTEX 2234 e *T. gigantea* UTEX 2231 (Figura 1.12). As amostras de *Ramalina fraxinea* e *R. farinaceae*, provenientes da Eslováquia, são as deste trabalho amostras que foram observadas neste Clado. Este clado é característica de regiões temperadas, nenhuma amostra de fotobiontes de líquens de regiões tropicais foi observada nesta clado, apenas alguns líquens provenientes da Antártida e Hemisfério Norte.

Embora o momento atual do estudo de fotobiontes de líquens ainda seja o de coleta de dados, a distribuição filogenética do gênero *Trebouxia*, principalmente no que diz respeito às posições de seus Clados, permite algumas discussões filogeográficas.

FIGURA 1.11.: DETALHE DA CLADO S, DA ÁRVORE FILOGENÉTICA DO GÊNERO *Trebouxia*. . OS VALORES DE SUPORTE INDICAM PROBABILIDADE POSTERIOR (BAYESIANA) E PARCIMÔNIA, RESPECTIVAMENTE

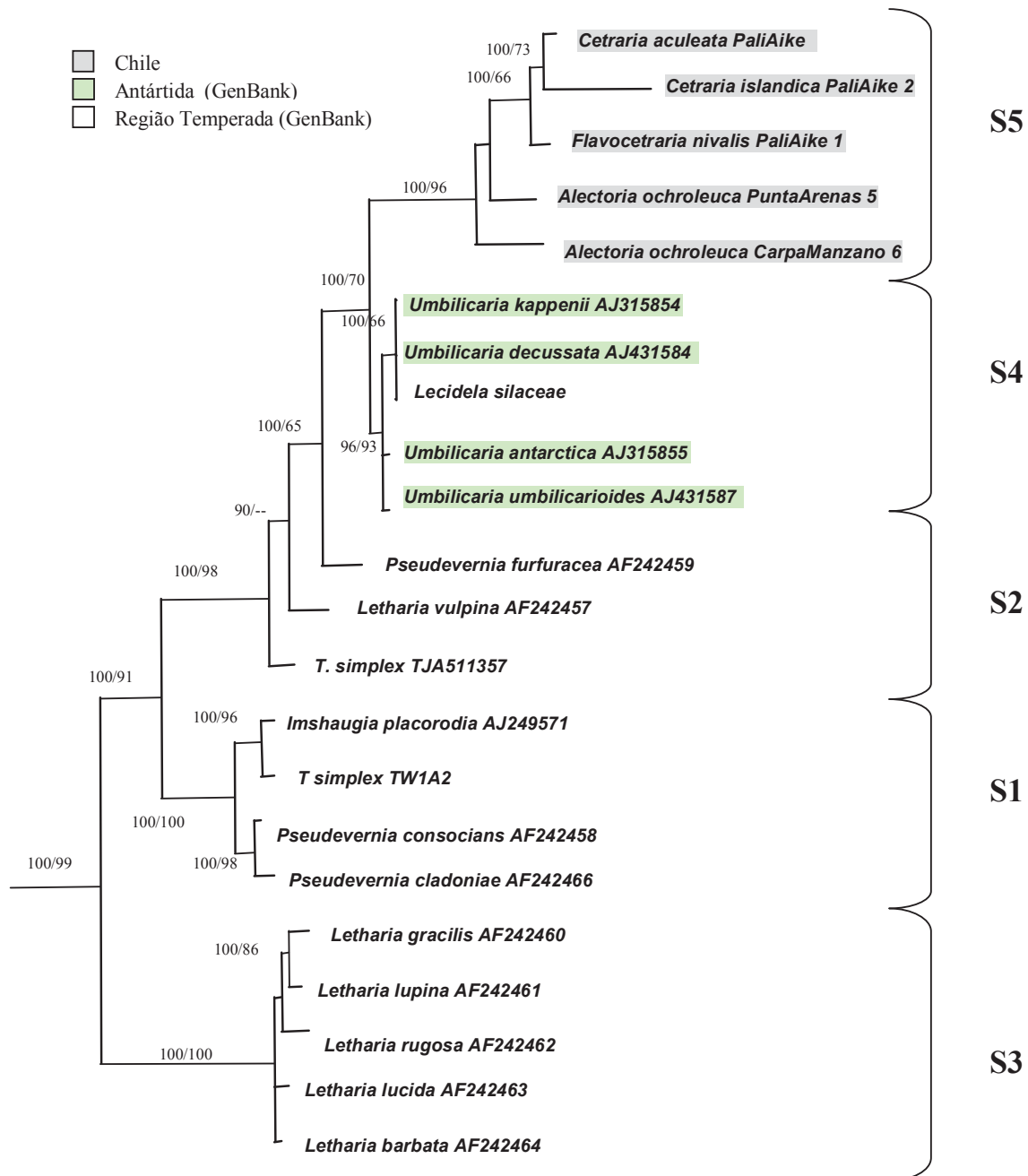
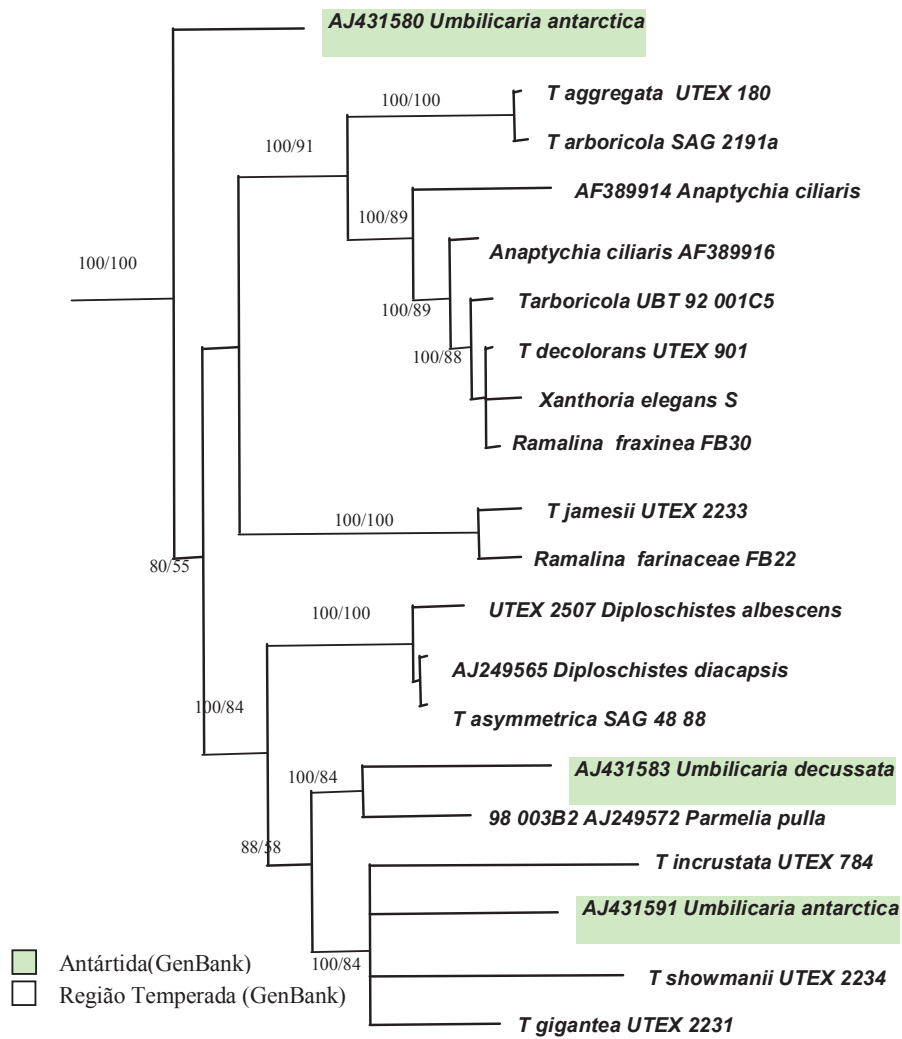


FIGURA 1.12: DETALHE DA CLADO A, DA ÁRVORE FILOGENÉTICA DO GÊNERO *Trebouxia*. . OS VALORES DE SUPORTE INDICAM PROBABILIDADE POSTERIOR (BAYESIANA) E PARCIMÔNIA, RESPECTIVAMENTE



A principal conclusão filogeográfica observada a partir da análise dos dados obtidos é a existência de linhagens de fotobiontes de líquens para regiões tropicais. Esse padrão existe tanto para *Asterochloris* como para *Trebouxia*, embora seja mais pronunciado nesta última espécie, com a presença de grandes grupos (Clados e Subclados) específicos para fotobiontes de líquens tropicais.

Curiosamente observa-se que o Clado I (Filogenia de *Trebouxia*) apresenta dois subclados distintos, um para fotobiontes de regiões tropicais e outro para fotobiontes de regiões temperadas. No Subclado de regiões temperadas (I3) verifica-se inclusive a presença de uma amostra proveniente da Antártida.

A relação monofilética existente entre os Clados G e S sugere uma topologia similar a existente no Clado I. Desta maneira o Clado G corresponderia a linhagem tropical (Subclados I4 e I5) e o Clado S corresponderia a linhagem temperada (Subclados I1, I2 e I3) (Figura 1.13). A relação entre os Subclados (Antártida) S4 e (Chile) S5, existente no Clado S conduz a uma outra teoria filogeográfica, a Teoria da Deriva dos Continentes.

Os primeiros fósseis de líquens sugerem que o processo de liquenização teve início a 400 milhões de anos atrás, era em que a massa continental da terra ainda constituía um continente único chamado *Pangea*. Nesta época o ancestral liquênico apresentaria uma ampla distribuição por toda a *Pangea*.

À medida em que o processo de deriva continental acontece e os continentes se afastam a mesma linhagem ancestral está presente. Com a estrutura atual dos continentes, líquens presentes em regiões tropicais foram submetidos a uma nova situação, como altas taxas de umidade e temperatura. Essas condições favorecem o metabolismo do líquen. É conhecido que líquens de regiões tropicais apresentam taxas metabólicas mais elevadas que quando comparados com líquens de regiões temperadas (HONEGGER, 1991). Desta maneira pode-se sugerir que as linhagens de fotobiontes de líquens tropicais são relativamente recentes quando comparadas com as regiões temperadas (figura 1.14).

FIGURA 1.13: TEORIA DA DISTRIBUIÇÃO FILOGEOGRÁFICA DE FOTOBIONTES DO GÊNERO *Trebouxia* BASEADA NA PRESENÇA DE LINHAGENS TROPICAIS.

VERDE – LINHAGENS TROPICAIS
AMARELO – LINHAGENS TEMPERADAS

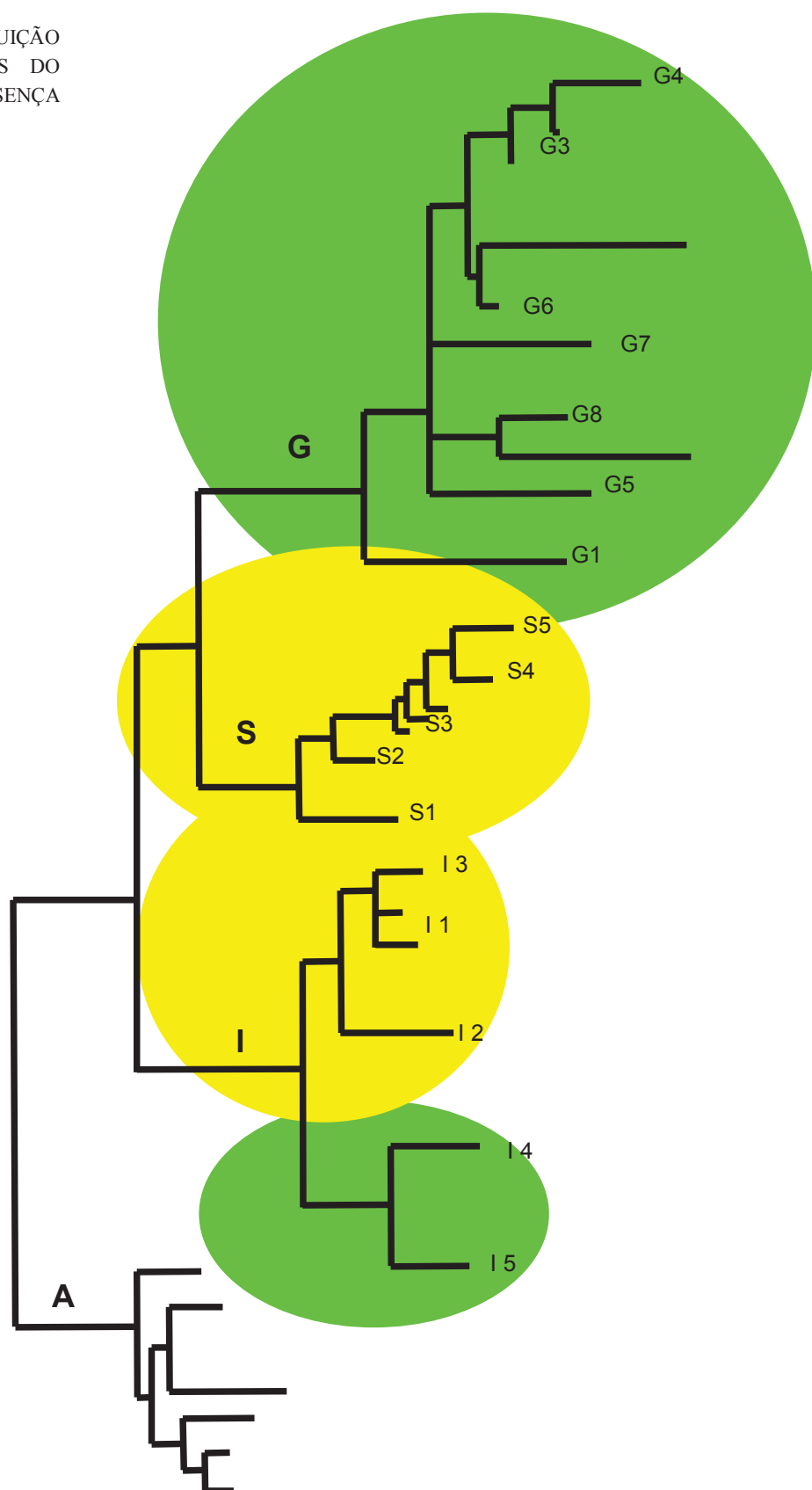
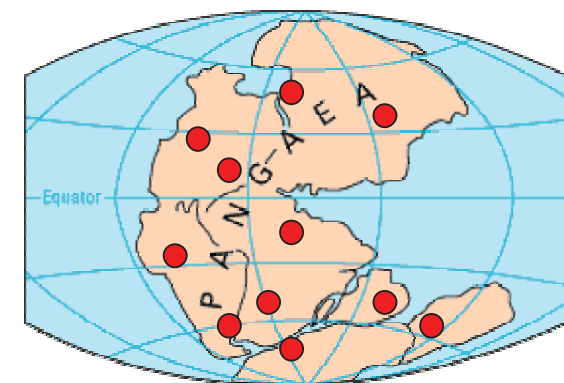


FIGURA 1.14: TEORIA DA DISTRIBUIÇÃO FILOGEOGRÁFICA DE FOTOBIONTES DO GÊNERO *Trebouxia* BASEADA NA DERIVA CONTINENTAL.

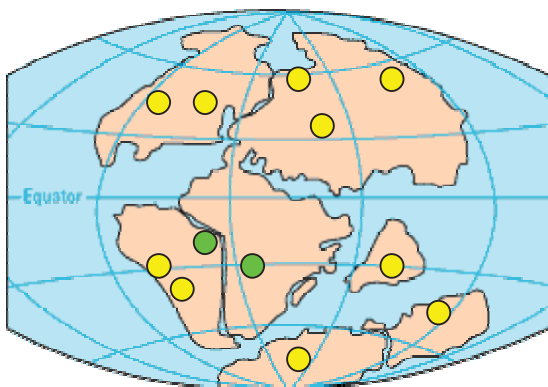
VERMELHO – ANCESTRAL

VERDE – LINHAGENS TROPICAIS

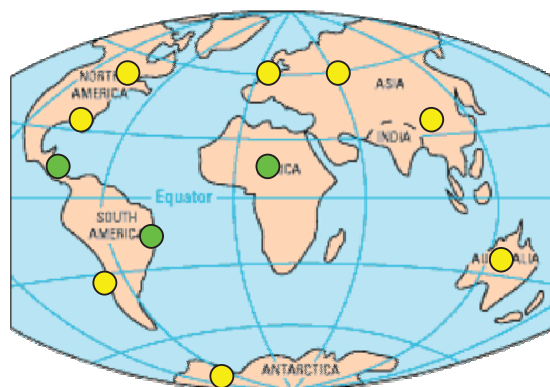
AMARELO – LINHAGENS TEMPERADAS



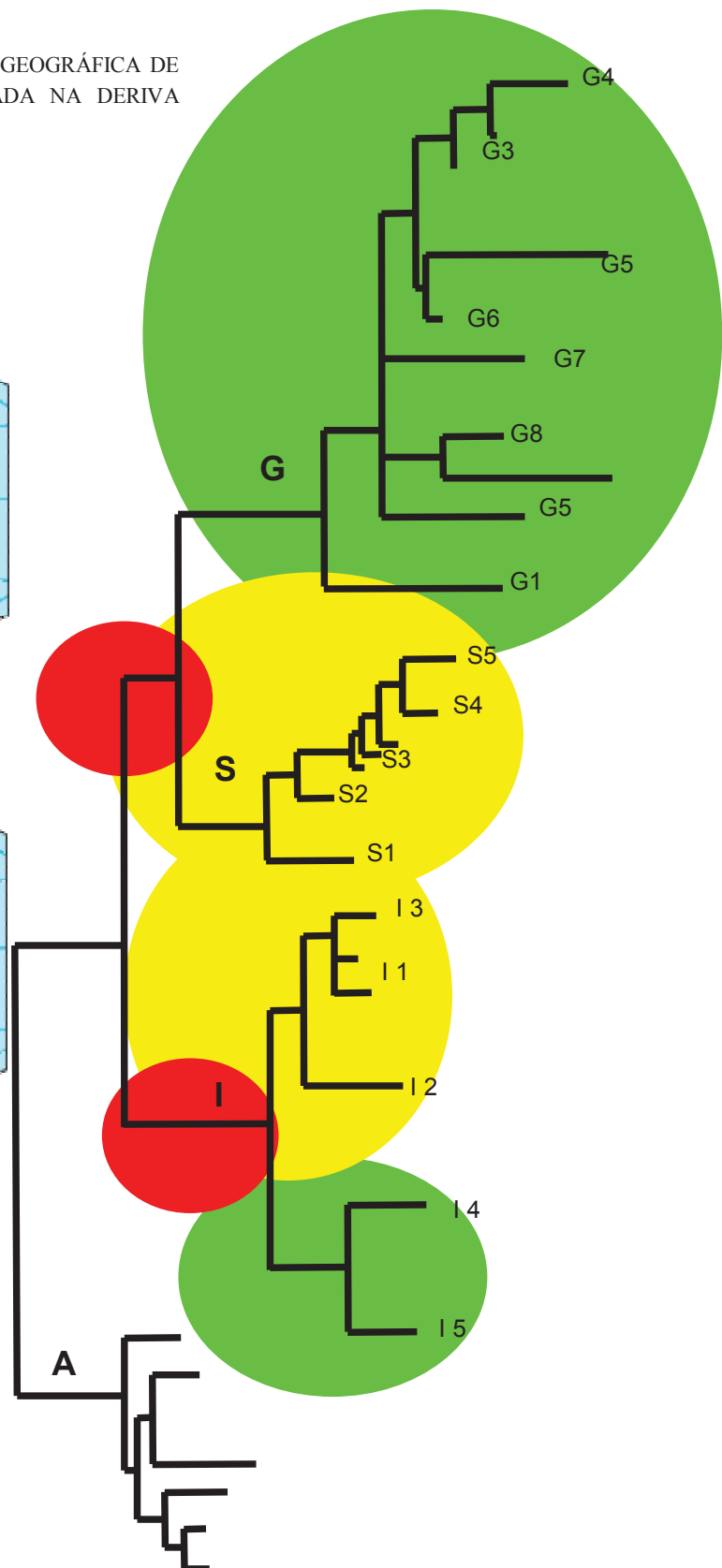
225 milhões de anos



135 milhões de anos



Hoje



Obviamente esta hipótese, embora apresente fortes indícios de ser verdadeira, ainda é especulativa e sua corroboração é dependente de mais dados, principalmente de líquens provenientes de regiões tropicais como a África e Índia. Amostras de líquens de regiões temperadas, porém meridionais como oeste da América do Sul (Chile, Argentina, etc..) podem também auxiliar muito a compreensão da história evolutiva de *Trebouxia*.

Por não ser conservada a região ITS rDNA apresenta uma grande variabilidade. Sendo assim, é importante ressaltar a necessidade de se comparar os resultados obtidos para a filogenia de ITS rDNA com outros genes mais conservados comumente utilizados em estudos filogenéticos de algas, como por exemplo os genes codificantes para Rubisco e Actina.

Ao analisar as linhagens de *Trebouxia* existentes como culturas, estas já descritas através de estudos morfológicos, observa-se diferenças em relação à delimitação morfológica de espécies e os resultados obtidos para a os dados de ITS. Se por um lado algumas espécies que apresentavam características morfológicas semelhantes foram identificadas como mais distantes do que se acreditava, por outro lado, organismos antes identificados como espécies diferentes foram agrupados em um mesmo táxon.

Os resultados aqui apresentados demonstram que a presente classificação existente, baseada na morfologia, não satisfaz a real diversidade do gênero *Trebouxia*. Embora GRUBE e KROKEN (2000) afirmem que a análise das regiões ITS não seja suficiente para a delimitação de espécies em líquens, este caráter parece apresentar uma melhor resolução taxonômica que o fenótipo apresentado pelas algas. Especialmente porque boa parte das descrições atuais estão embasadas apenas em uma única cultura (linhagem), não admitindo possíveis variações morfológicas de uma mesma espécie.

Recentemente HELMS (2003) propôs a aplicação de uma nova nomenclatura para as espécies do gênero *Trebouxia*, onde utilizar-se-ia letras e números para a descrição da espécie, sendo que neste caso os Subclados apresentariam o status de espécie. No entanto essa “nova classificação” seria baseada apenas no conceito filogenético de espécie.

A identificação de novas espécies é sempre um dilema, principalmente no que diz respeito às espécies impossíveis de serem classificadas pelo conceito biológico de espécie, ou seja, aquelas que não apresentam reprodução sexuada.

Para este trabalho preferiu-se não delimitar novas espécies baseado somente na filogenia da região ITS. Sendo assim, alguns líquens foram selecionados para a obtenção de culturas puras (axênicas) e desta maneira analisar a morfologia, ciclo de vida e ultra-estrutura almejando uma resposta mais próxima da realidade.

Os dados preliminares com respeito ao isolamento, cultivo e identificação de alguns fotobiontes de líquens serão apresentados no capítulo 2 deste trabalho.

1.5. Conclusões.

A partir dos dados apresentados, as principais conclusões obtidas para o Capítulo 1 são:

- A presença de linhagens tropicais existentes para as espécies de fotobiontes *Trebouxia* e *Asterochloris*.
- Em *Asterochloris*, as amostras tropicais, embora não representem uma linhagem exclusiva, apresentam uma origem monofilética e estão relacionadas com fotobiontes de regiões temperadas.
- Em *Trebouxia* as linhagens tropicais são bem delimitadas e surgiram em dois momentos na história evolutiva da espécie: um no Clado G e outro no Clado I.

Capítulo 2: Cultivo de simbiontes líquênicos

2.1. Introdução

Devido ao fato da natureza dualística dos líquens, questões como o comportamento dos componentes da simbiose em uma situação de isolamento ou se a química dos líquens poderia ser mimetizada em condições de cultivo, são freqüentes alvos de estudo. Nos últimos vinte anos tem aumentado o interesse em estudos de isolamento e cultivo de líquens e seus simbiontes isolados. O principal ponto abordado é em relação à capacidade de produção de moléculas produzidas pela simbiose em um estado axênico (ou seja, puro) de cultura (CRITTENDEN et al., 1995). Outro assunto amplamente estudado é em relação às tentativas de se restabelecer a simbiose a partir dos biontes isolados (STOCKER-WÖRGÖTTER, 2001; HONNEGER, 1991) e desta maneira tentar compreender os mecanismos envolvidos neste intrigante e ainda desconhecido processo de liquenização.

Entretanto os líquens são organismos que apresentam uma grande dificuldade de isolamento e crescimento, sendo as lentas taxas de crescimento um grande obstáculo para o sucesso destes processos (CRITTENDEN et al., 1995; STOCKER-WÖRGÖTTER, 1995). Comparando com fungos de vida livre a taxa de crescimento do micobionte é extremamente lenta, e este fator tem sido a principal dificuldade para a investigação fisiológica dos estados axênicos (CRITTENDEN et al., 1995).

Nos últimos 30 anos os trabalhos de isolamento e cultivo realizados por Vernon Ahmadjian (AHMADJIAN, 1967; AHMADJIAN, 1973; AHMADJIAN & JACOBS, 1981) estimularam o interesse de outros pesquisadores nesta área promovendo um progresso nestas últimas três décadas na pesquisa com micobiontes, fotobiontes e resíntese de líquens a partir dos biontes isolados (YAMAMOTO et al., 1985; STOCKER-WÖRGÖTTER, 2001; STOCKER-WÖRGÖTTER, 2002). Avanços na área de microbiologia, incluindo a disponibilidade de equipamentos laboratoriais mais avançados são outros fatores que estimularam o recente progresso desta área da liquenologia (STOCKER-WÖRGÖTTER, 1995).

Líquens são conhecidos por produzirem uma grande diversidade de compostos químicos, sendo muitos deles exclusivos destes organismos. A busca de moléculas

farmacologicamente ativas faz destes organismos interessantes do ponto de vista biotecnológico. Diversos estudos demonstraram que compostos de líquens, entre metabólitos secundários e polissacarídeos, podem apresentar atividade antimicrobiana (XAVIER-FILHO et al., 1990; YAMAMOTO et al., 1993), anti-micótica (YAMAMOTO et al., 1993; SHAHI et al., 2001), anti-inflamatória (HIGUCHI, et al., 1993), anti-viral e anti-tumoral (CARNEIRO-LEÃO et al., 1997; STUELP-CAMPELO et al., 2002).

Entretanto, líquens apresentam uma lenta taxa de crescimento, mesmo em seu habitat natural e programas de coleta em larga escala podem colocar em risco a integridade biológica destes organismos. Desta maneira a utilização de cultivo de simbiontes líquênicos, buscando a obtenção de compostos ativos, mostra-se como uma importante ferramenta biotecnológica a ser explorada.

Estudos recentes demonstraram a capacidade dos micobiontes em produzirem metabólitos secundários em culturas axênicas (HAMADA & MIYAGAWA, 1995; STOCKER-WÖRGÖTTER & ELIX, 2002; ROSSO et al., 2003; CORDEIRO et al., 2004). Porém, algumas destas substâncias produzidas podem diferir daquelas originalmente encontradas no líquen. Alguns autores sugerem a utilização de algum tipo de estresse (temperatura, osmótico, UV) como ativador destas vias metabólicas (HAMADA & MIYAGAWA, 1995; STOCKER-WÖRGÖTTER & ELIX, 2002; SOLHAUG et al., 2002). STOCKER-WÖRGÖTTER e colaboradores (2002), por exemplo, submeteram o micobionte de *Lobaria spathulata* a baixas temperaturas por duas semanas a cada seis semanas e obtiveram a síntese de compostos secundários, sugerindo que a produção destes metabólicos possa ser uma resposta as condições ambientais a que os líquens estão submetidos.

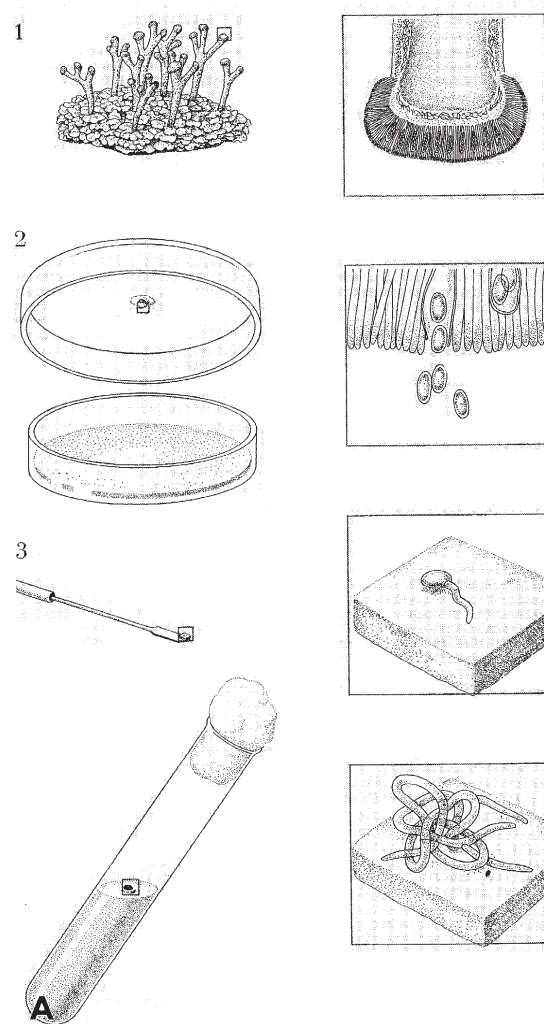
Outro fator interessante é com relação a possibilidade de se utilizar o cultivo dos simbiontes isolados em processos de ressíntese, tentando assim uma melhor compreensão dos processos de reconhecimento e de interação existentes nesta simbiose (HONNEGER, 1991; AHMADJIAN, 1993). O primeiro processo de ressíntese de líquens data de 1966 (AHJMADJIAN, 1966), desde então diversos estudos envolvendo culturas de ambos simbiontes foram realizados, entre eles a seletividade do micobionte pelo fotobionte (AHMADJIAN & JACOBS, 1981) e lectinas envolvidas no processo de reconhecimento (BUBBRICK et al., 1981; 1982; 1983; MOLINA et al, 1996).

Algumas revisões descrevem várias metodologias para o isolamento e cultivo dos simbiontes liquênicos entre elas o uso de: esporos, fragmentos de talo, conídios, sorédios, ultracentrifugação, micropipetas, micromanipuladores, entre outros. Porém, os métodos mais utilizados são a obtenção de colônias através de esporos e fragmentos de talo para micobiontes e micropipetagem e fragmentos de talo para fotobionte (BUBBRICK, 1988; AHMADJIAN, 1993; CRITTENDEN et al., 1995).

O método de isolamento (figura 2.1) através de esporos tornou-se o mais popular para líquens que apresentam estruturas reprodutivas, e é baseado na obtenção de cultura através da germinação de esporos eliminados pelo apotécio. Muitos esforços foram realizados na tentativa de se obter colônias originadas de esporos únicos, principalmente com o objetivo de se estudar os diferentes quimio-tipos presentes em líquens. Mais recentemente estudos com diversas espécies do gênero *Xanthoria*, através do crescimento de esporos, demonstrou que *Xanthoria parietina* trata-se de um líquen homotático, enquanto que outras cinco espécies apresentam-se como heterotáticos (HONEGGER et al., 2004). Outro método de cultivo utilizando esporos é a obtenção de cultura a partir de esporos múltiplos, a qual apresenta-se mais simples e com melhor desenvolvimento das colônias. A metodologia utilizando esporos apresenta-se como o mais confiável, uma vez que a colônia obtida a partir de esporos apresentaria um risco reduzido de ser um possível contaminante (AHMADJIAN, 1993, 1973, BUBBRICK, 1988, STOCKER-WORGOTTER, 1995, CRITTENDEN et al., 1995).

A metodologia de fragmento de talo é muito utilizada para líquens estéreis, ou seja, que não apresentam a formação de apotécio ou esporos (figura 2.2). Este método foi descrito por YAMAMOTO (1985), como uma modificação do método de cultivo de tecidos vegetais, comumente utilizado para plantas. Embora este método seja amplamente utilizado atualmente, foi primeiramente rejeitado devido às altas taxas de contaminação e a incerteza de purificação do micobionte correto com o método. A modernização dos métodos de microbiologia, como utilização de bancadas de fluxo laminar, e novas técnicas de biologia molecular para identificação das espécies tornam este método relativamente rápido (quando comparado com a germinação de esporos), econômico (necessitando de pouca quantidade de material) e eficiente para o isolamento de micobiontes (YOSHIMURA et al., 1994; STOCKER-WÖRGÖTTER, 1998; 2001; 2002).

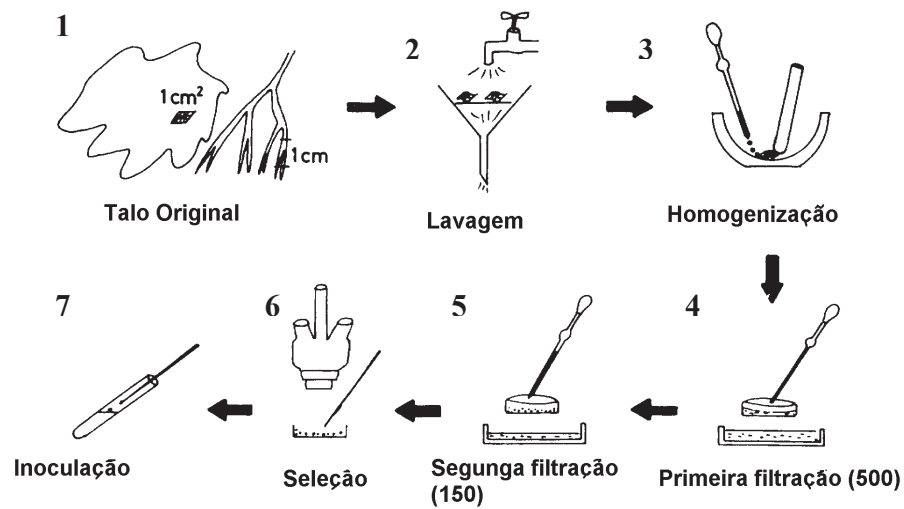
FIGURA 2.1: METODOLOGIA DE ISOLAMENTO DE MICOBIONTE ATRAVÉS DE ESPOROS (AHMADJIAN, 1973)



- 2- SELEÇÃO DO APOTÉCIO
- 3- ESPOROS SENDO LIBERADOS DE UM APOTÉCIO FIXADO EM PLACA DE PETRI
- 4- ESPORO GERMINADO SENDO TRANSFERIDO PARA UM CONTENDO MEIO ORGÂNICO.
- 5- DESENVOLVIMENTO DO ESPORO EM MICÉLIO.

AS IMAGENS DA DIREITA REPRESENTAM UMA AMPLIAÇÃO DAS IMAGENS DA ESQUERA.
EXTRAÍDO DE AHMADJIAN. 1993.

FIGURA 2.2: METODOLOGIA DE ISOLAMENTO DE MICOBIONTE ATRAVÉS DE FRAGMENTOS DE TALO (YAMAMOTO ET AL., 1985).



- 1- SELEÇÃO DO FRAGMENTO DE TALO
- 2- LAVAGEM EM ÁGUA CORRENTE
- 3- HOMOGENIZAÇÃO EM GRAAL.
- 4- FILTRAÇÃO EM MEMBRANA DE 500µm
- 5- FILTRAÇÃO EM MEMBRANA DE 150µm
- 6- SELEÇÃO DE FRAGMENTOS
- 7- INOCULAÇÃO DOS FRAGMENTOS SELECIONADOS EM MEIO ORGÂNICO

EXTRAÍDO DE AHMADJIAN, 1993.

STOCKER-WORGOTTER (2002) demonstrou que colônias obtidas através dos métodos de isolamento acima citados poderiam ser multiplicadas por subcultivo, através da maceração e re-inoculação das culturas desenvolvidas. Além disso, o mesmo autor observou que alguns micobiontes apresentam um bom crescimento em culturas estacionárias, enquanto outros se apresentam melhor em cultivo submerso com agitação. A utilização destes novos métodos de cultivo pode gerar uma grande quantidade de material fúngico, o que conseqüentemente abre novas perspectivas nos campos de farmacologia e biotecnologia.

Com relação ao isolamento de fotobionte liquênicos, a primeira técnica descrita na literatura foi proposta por AHMADJIAN (1967), pela qual um pequeno fragmento do líquen era colocado em uma solução mineral ou sobre uma superfície de ágar e inoculado na luz. Após algumas semanas era esperado que as condições de umidade e luz provocassem o crescimento do fotobionte em detrimento ao componente fúngico. Os fragmentos deveriam ser transferidos várias vezes, devido ao denso crescimento de algas contaminantes.

Outra metodologia descrita pelo mesmo autor é a micropipetagem, em que as culturas de algas são obtidas a partir de uma única célula (AHMADJIAN, 1967; 1973). Posteriormente métodos baseados em centrifugação seqüencial utilizando gradientes de KI, CsCl₂ foram propostos, porém estes compostos mostraram-se tóxicos para as células (BUBBRICK, 1988). Mais recentemente o uso de gradientes de Percoll® foi utilizado e os resultados demonstraram que as células se mantiveram fotossinteticamente ativas (CALATAYUD et al., 2001). PÈREZ et al., (1985) utilizaram filtração em gel (Sephacrose 2B®) para o isolamento de fotobiontes, porém este procedimento além de demorado, requer etapas posteriores de concentração de células o que poderia levar a danos celulares e contaminação.

Em 2002, STOCKER-WOGOTTER propõe a modificação do método de YAMAMOTO (1985), originalmente descrito para o isolamento do micobionte. A modificação consiste de: (a) seleção de fragmentos verdes (ricos em algas) e (b) inoculação em presença de luz. A partir de então vários fotobiontes foram isolados utilizando este método.

2.2. Objetivos

2.2.1. Objetivo geral

Este trabalho tem como objetivo o isolamento e cultivo dos simbiontes (micobionte e fotobionte) de diversos líquens.

2.2.2. Objetivos específicos

- Isolar e cultivar os simbiontes do líquen *Teloschistes flavicans* no intuito de se obter biomassa para análise de seus respectivos constituintes estruturais,
- Isolar e cultivar os micobiontes de diversos líquens utilizando as metodologias de fragmento de talo e germinação de esporos.
- Isolar e cultivar os fotobiontes de diversos líquens utilizando a metodologia de fragmentação de talo.

2.3. Materiais e métodos

2.3.1 Líquens

Algumas espécies de líquens foram submetidas ao isolamento de um ou ambos simbiontes. A Tabela 2.1 apresenta quais líquens foram submetidos a este processo, e quais métodos foram utilizados para cada amostra. Os métodos empregados foram: a) germinação de esporos e/ou fragmentos de talos para o micobionte e b) fragmentos de talo para o fotobionte.

A completa descrição dos locais de coleta e depósito em herbário encontra-se detalhada na tabela 1.2.

TABELA 2.1 : LIQUENS SUBMETIDOS AO PROCESSO DE ISOLAMENTO DE SEUS SIMBIONTES.

Líquen	*Nº amostra	Micobionte		Fotobionte
		Esp.	Frag	Frag
<i>Cladia aggregata</i>	R 152		X	X
<i>Cladonia ceratophylla</i>	R 136		X	X
<i>Cladonia</i> sp.	R 137		X	X
<i>Heterodermia caesarettiana</i>	R 8		X	X
<i>Physcia aipolia</i>	M 1	X		
<i>Physcia atrostriata</i>	R 4	X	X	X
<i>Physcia sinuosa</i>	R 1		X	X
<i>Physconia distorta</i>	M 2	X		
<i>Pyxine</i> sp.	R 5		X	X
<i>Ramalina anceps</i>	R 78		X	X
<i>Ramalina celastri</i>	R 74		X	X
<i>Ramalina peruviana</i>	R 67		X	X
<i>Siphula pteruloides</i>	M 3		X	X
<i>Stereocaulon</i> sp.	R 135		X	X
<i>Teloschistes exilis</i>	R 54	X		
<i>Teloschistes flavicans</i>		X	X	X
<i>Xanthoria parietina</i>	M 4	X		

*):número amostra, baseada na extração de DNA.

Esp: Metodologia de isolamento baseada em germinação de esporos.

Frag: Metodologia de isolamento baseada em fragmentos de talo. .

2.3.2. Isolamento e cultivo dos micobiontes.

Para o isolamento do micobionte foram utilizadas duas metodologias: a partir de fragmentos de talo (YAMAMOTO et al., 1985) e a partir de esporos (AHMADJIAN, 1973).

A metodologia de isolamento do micobionte a partir de fragmentos de talo, conhecida com técnica de YAMAMOTO, foi descrita por YAMAMOTO e colaboradores em 1985 (Figura 2.2). A partir do líquen recém coletado, pequenos fragmentos foram selecionados com auxílio de lupa. Preferencialmente foram selecionados os fragmentos apicais, em geral os mais jovens e com crescimento mais ativo. Estes fragmentos foram lavados em água corrente por 2-3 horas, posteriormente foram novamente selecionados aqueles que apresentaram uma melhor estrutura. Uma segunda lavagem é realizada com uma pequena quantidade de Tween 80® em água estéril. Após este procedimento, a retirada do detergente é realizada com três lavagens com água estéril, sendo os fragmentos colocados em uma placa de petri estéril (contendo papel filtro). Terminado o processo de lavagem, estes se encontram prontos para o processo de isolamento.

Após o processo de lavagem, os fragmentos foram macerados, em 2 ml de água, com auxílio de graal e pistilo estéreis. O macerado resultante foi sequencialmente filtrado em uma membrana de 500 µm e 150µm. Fragmentos retidos na última membrana foram selecionados com auxílio de palitos de madeira (estéreis) e inoculados em tubos contendo meio de cultura. Apenas um fragmento foi inoculado em cada tubo. Foram utilizados 25 tubos para cada amostra testada.

O método de isolamento a partir de esporos foi descrito por AHMADJIAN (1973), e foi realizado apenas com os líquens que apresentaram apotécios (estruturas reprodutivas do micobionte) Figura 2.1.

Os apotécios foram selecionados sob lupa e removidos dos líquens, sendo posteriormente lavados em água corrente por uma hora. Com auxílio de vaselina sólida estéril, foram fixados na tampa das placas de petri contendo o meio BBM-ágar (Material e Métodos). As placas foram deixadas com as tampas para baixo, de maneira que os esporos fossem ejetados para o meio de cultura. Este processo levou em média 48 horas, entretanto maiores períodos foram utilizados em placas onde não ocorreu a ejeção de esporos. As

tampas foram então trocadas por outras novas e estéreis. Após a germinação dos esporos, observada em lupa ou microscópio, estes foram coletados com agulha de platina e inoculados em tubos contendo meios de cultura para o desenvolvimento das colônias. Foram utilizados 25 tubos para cada amostra testada.

Os tubos contendo culturas dos micobiontes foram mantidos em câmara de cultivo a 27°C, em completa escuridão por três meses, no intuito de promover o crescimento exclusivo dos micobiontes. Após este período as culturas foram submetidas a um fotoperíodo de 12 h luz /12 h escuro. As colônias que se desenvolveram foram submetidas a repique para a multiplicação das culturas e obtenção de biomassa para a análise de polissacarídeos e ácidos graxos. Colônias com 3 meses de cultivo foram removidas do ágar, trituradas em água estéril e re-inoculadas em novas placas contendo meio de cultura.

Após 4 meses de cultivo, as colônias do micobionte de *Teloschistes flavicans* foram coletadas das placas, liofilizadas e submetidas a processos de extração para a análise de seus polissacarídeos e ácidos graxos conforme descrito nos Capítulos 3 e 4.

2.3.3. Isolamento e cultivo dos Fotobiontes

O isolamento dos fotobiontes foi realizado através do método de fragmento de talo, em um procedimento muito similar ao descrito por YAMAMOTO et al. (1985). O processo é semelhante ao descrito anteriormente até a seleção dos fragmentos. Neste ponto, para a obtenção de culturas do fotobionte, fragmentos verdes, contendo algas, foram selecionados. Estes fragmentos foram inoculados em tubos contendo meios de cultura. Para os fotobiontes assim como os micobiontes foram utilizados 25 tubos para cada amostra testada.

Os tubos contendo culturas dos fotobiontes foram mantidos a 22°C, em um fotoperíodo de 12 h luz/12 h escuro, sob uma radiação incidente de $45 \text{ mol.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$, até o desenvolvimento das colônias. Uma vez crescidas as colônias foram repicadas para placas de petri contendo meio BBM (meio mineral), constituindo assim estoques das culturas. As placas foram mantidas por 40 dias nessas condições, sendo que após este período as culturas foram analisadas em microscopia ótica para a determinação de seu ciclo de vida e morfologia.

A partir dos estoques, o fotobionte de *Teloschistes flavicans* foi cultivado em meio TM ou BBM, líquido, sob agitação constante de 90 r.p.m., nas mesmas condições descritas acima. Após 30 dias, as algas foram retiradas do meio de cultivo por centrifugação ou filtração em funil Büchner. O material obtido foi lavado em água destilada e liofilizado. A massa de algas resultante foi utilizada para a determinação dos polissacarídeos e ácidos graxos, conforme descrito nos capítulos 3 e 4.

2.3.4. Meios de Cultura

Foram testados meios de cultura contendo diferentes fontes de carbono e nitrogênio (STOCKER-WÖRGÖTTER, 2002).

1-Sabourand 4% glucose – agar (S4%)

Peptona de carne.....	10g
D-glucose.....	40g
Agar.....	18g
Água.....	1000mL

2-Extrato de Malte e Levedura (MY)

Extrato de levedura.....	2g
Extrato de Malte.....	20g
Agar.....	18g
Água	1000mL

3-Lilly e Barnett – glucose 4% (LBM)

D-glucose.....	40g
L-asparagina.....	2g
MgSO ₄ .7H ₂ O.....	0,5g
KH ₂ PO ₄	1g
Fe(NO ₃) ₃ .9H ₂ O.....	0,2mg
ZnSO ₄ .7H ₂ O.....	0,2mg
MnSO ₄ .H ₂ O.....	0,1mg
Tiamina.....	100µg
Biotina.....	5µg
Agar.....	18g
Água.....	1000mL

4-Basal Bold Médium (BBM)

Parte 1: Seis soluções estoque, cada uma contendo os seguintes sais em um volume final de 400 mL.

NaNO₃.....10g
 CaCl₂.....1g
 MgSO₄.7H₂O.....3g
 K₂HPO₄.....3g
 KH₂PO₄.....7g
 NaCl.....1g

Adicionar 10 mL de cada solução estoque a 940 mL de água.

Parte 2: Quatro soluções estoque.

1. H₃BO₃ (11,42g/l)
2. FeSO₄.7H₂O(4,98g/l), ZnSO₄.7H₂O(8,82g/l), MnCl₂.4H₂O(1,44g/l).
3. MoO₃ (0,71 g/l), CuSO₄.5H₂O(1,57g/l), Co(NO₃)₂.6H₂O(0,49g/l).
4. EDTA(50g/l), KOH(31g/l).

Adicionar 1 ml de cada solução à Parte 1.

5- Meio para Trebouxia (TM)

970 mL de meio BBM.

D-glucose.....20g
 Peptona.....10g.

2.4. Resultados e discussão

O isolamento dos micobiontes foi desenvolvido em duas partes. Em um primeiro momento foi realizado o isolamento dos simbiontes do líquen *Teloschistes flavicans*. O micobionte de *T. flavicans* foi iniciado em setembro de 2001, pela Dra. Lucimara Cordeiro, durante seu doutorado sanduíche no Departamento de Fisiologia Vegetal, da Universidade de Salzburg (Institut für Pflanzenphysiologie, Universität Salzburg, Hellbrunner Straße, 34, A-5020, Salzburg) Áustria, sob orientação da Dra. Elfriede Stocker-Wörgötter.

No final de 2002, o isolamento do micobionte foi novamente realizado, desta vez na Universidade Federal do Paraná. Nesta mesma época realizou-se também o isolamento do fotobionte do líquen *T. flavicans*. As amostras isoladas no Departamento de Bioquímica da UFPR foram utilizadas para a caracterização estrutural de suas moléculas.

O isolamento dos outros líquens utilizados neste estudo foi realizado, ou no Laboratório de Química de Carboidratos da UFPR, ou no Instituto de Ciências Vegetais da Universidade da Karl-Franzens Universidade de Graz (Institut für Plant Sciences, Karl-Franzens Universität, Graz) Áustria, no laboratório do Prof. Dr. Martin Grube.

Os resultados serão aqui mostrados conforme o cronograma de isolamento, ou seja, primeiramente serão apresentados os resultados referentes ao isolamento dos simbiontes do líquen *T. flavicans*. Em seguida serão apresentados os dados referentes ao isolamento dos simbiontes de outros líquens testados.

2.4.1. Isolamento dos simbiontes de *T. flavicans*.

A espécie *T. flavicans* Norman, é uma espécie preferencialmente cortícola, ou seja, desenvolve-se sobre o córtex de árvores. Talo fruticoso, relativamente grande (2-10 cm de diâmetro), altamente ramificado, com ramos rígidos. A coloração do talo é variável, desde amarelo avermelhado até amarelo acinzentado. A presença de apotécio é rara, entretanto mais freqüente em regiões litorâneas tropicais, sendo seus esporos hialinos, biloculares e elipsoidais (ALBORN, 1989). Segundo TEHLER (1996) o líquen *Teloschistes flavicans* pertence a subdivisão Dicariomcotina, Classe Ascomicetos, Subclasse Euascomicetos, Ordem Lecanorales, Sub-ordem Teloschistineae, Família Teloschistaceae.

FIGURA 2.3: LíQUEN *Teloschistes flavicans*.
DETALHE: ESPOROS.
ESCALA: 5 μ M



2.4.1.1. Micobionte

O líquen *T. flavicans* (figura 2.3) apresentou um alto número de apotécios, sendo, portanto, apropriado para o isolamento dos micobiontes a partir de esporos, seguindo a metodologia descrita por AHMADJIAN (1973). Os apotécios selecionados apresentaram esporos elipsoidais, hialinos e biloculares (figura 2.3, detalhe), os quais foram ejetados para cima na superfície do ágar entre 24 e 48 horas.

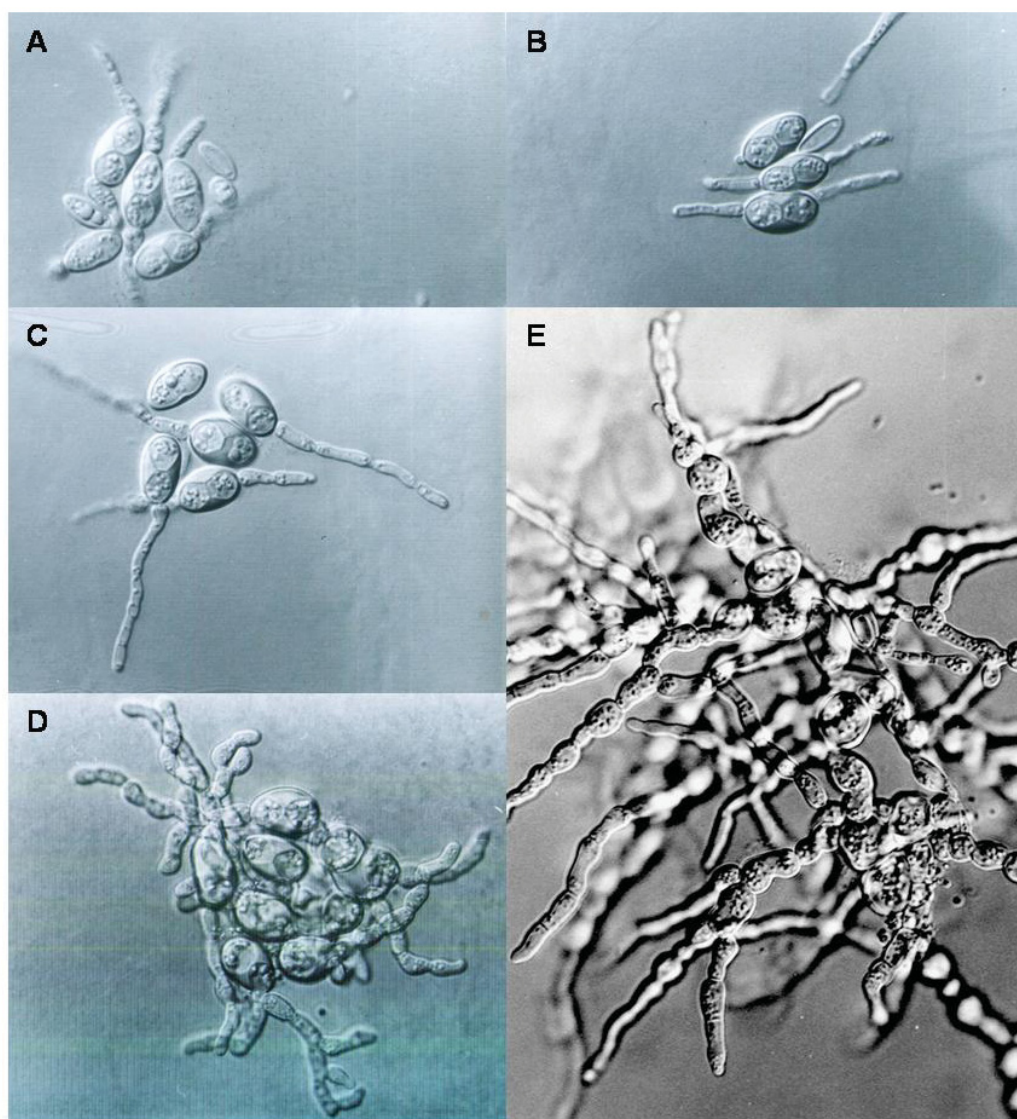
Os esporos germinaram após 4 dias de incubação no meio inorgânico, sendo então transferidos para o meio de nutrientes (LBM, MY). Após 5 meses de cultivo observou-se que 78% dos micélios apresentaram crescimento, alcançando uma colônia de 5 mm (ou seja, um crescimento médio de 1 mm.mês⁻¹).

Após 5 meses, efetuou-se a multiplicação das colônias desenvolvidas nos tubos contendo meio LBM. Estas foram retiradas do tubo, maceradas no graal e re-inoculadas em placas contendo o meio LBM. E após 4 meses este procedimento foi repetido utilizando as colônias desenvolvidas na placa, no intuito de se obter biomassa para a extração e caracterização dos polissacarídeos.

Desde o primeiro repique, em setembro de 2002, até a coleta de todos os micélios em setembro de 2004, 123 placas foram cultivadas. A biomassa obtida foi de 8,7 gramas de material liofilizado. Esse resultado corresponde a uma média de 70 mg de micélio (liofilizado) por placa, durante 4 meses de cultivo.

Como o objetivo deste trabalho era a obtenção de material micelial para o desenvolvimento das extrações, não foi desenvolvida nenhuma curva de crescimento para o micobionte de *T. flavicans*. A figura 2.4 apresenta todo o desenvolvimento do isolamento e cultivo micobionte de *T. flavicans*.

FIGURA 2.4: PROCESSO DE ISOLAMENTO DO MICOBIONTE DE *Teloschistes flavicans*



A E B) ESPOROS GERMINANDO COM 4 DIAS. C E D) ESPOROS COM 11 DIAS. E) MICÉLIO EM INÍCIO DE DESENVOLVIMENTO COM 30 DIAS. AUMENTO 1000 X.

2.4.1.2. Fotobionte

O fotobionte de *T. flavicans* foi isolado segundo a metodologia de fragmentação de talo descrita por YAMAMOTO e colaboradores (1985). Na figura 2.10 podemos observar o aspecto rugoso e verde claro da colônia que se desenvolveu a partir de um fragmento do talo de *T. flavicans* em meio TM.

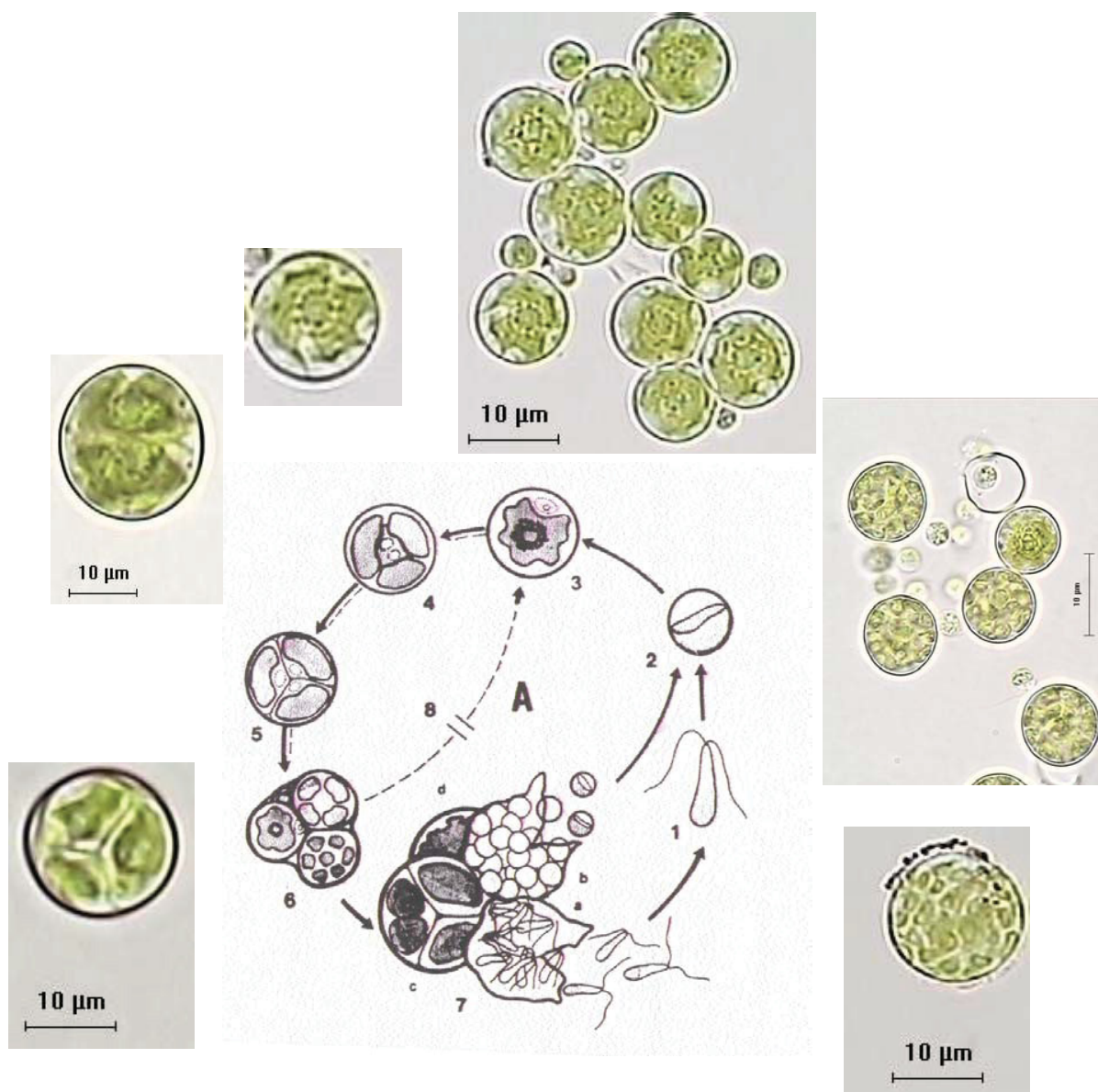
Para a observação do ciclo de vida a alga foi cultivada em meio inorgânico BBM-água 2% por 40 dias, segundo descrito em literatura (AHMADJIAN & JACOBS, 1981; FRIEDL, 1989a,b). O ciclo de vida obtido apresenta-se similar ao ciclo A descrito por FRIEDL (1993). Análises posteriores indicaram que a maioria das algas que apresentam o ciclo de vida A são reconhecidas hoje como *Trebouxia*, enquanto que aquelas que apresentaram o ciclo de vida B são hoje conhecidas como pertencentes ao gênero *Asterochloris* (HELMS, 2003).

Em *Trebouxia*, as células vegetativas apresentam formato esférico, de 10 a 15µm de diâmetro. Cloroplasto único e central, ocupando quase todo o citoplasma. O citoplasma apresenta formato de estrela, com lobos de diferentes tamanhos. Pirenóides únicos, esféricos e margeados por uma bainha não contínua de grãos escuros, provavelmente de amido. O núcleo apresenta-se em um dos lobos do cloroplasto.

Nos fotobiontes de *T. flavicans* a reprodução assexuada por meio de autósporos, zoósporos e aplanósporos. A figura 2.5 mostra estas estruturas e sua representação no ciclo de vida de fotobionte de *T. flavicans*. Segundo TSCHERMARK-WOESS (1989), fotobiontes que apresentam autósporos pertencem ao gênero *Trebouxia*, subgênero *Trebouxia*. Em contrapartida, aqueles que só apresentam zoósporos e aplanósporos são classificados como *Trebouxia*, subgênero *Eleutherococcus* (TSCHERMARK-WOESS, 1989). Posteriormente RAMBOLD et al. (1998), utilizando dados moleculares, especificidade fotobionte x micobionte e dados morfológicos, classificaram que as espécies que apresentam autósporos pertencem ao gênero *Trebouxia*. Em contrapartida, aqueles que não apresentam autósporos são classificados como *Asterochloris*.

Desta maneira, a partir dos dados obtidos pelo ciclo de vida (Figura 2.5), juntamente com os dados de biologia molecular apresentados no capítulo 1, pode-se concluir que o fotobionte de *Teloschistes flavicans* pertence ao gênero *Trebouxia*.

FIGURA 2.5: DESENHO ESQUEMÁTICO APRESENTANDO O CICLO DE VIDA DA ALGA *Trebouxia* EM CULTURA (FRIEDL, 1989). AS FOTOGRAFIAS RERESENTAM O CICLO DE VIDA DO FOTOBIONTE DE *T. flavicans*.



O CICLO INICIA-SE COM O ZOÓSPORO LIVRE (1), QUE PARA, ABSORVE SEU FLAGELO E DESENVOLVE-SE EM CÉLULA VEGETATIVA NÃO MÓVEL (2), QUE AMADURECE (3) E DIVIDE-SE (4,5), PARA FORMAR AUTÓSPOROS (6) E ZOÓSPOROS (1). GRUPOS DE AUTÓSPOROS DISSOCIAM-SE EM CÉLULAS ÚNICAS (8).

AUTÓSPORO INICIANDO A DIVISÃO DO CLOROPLASTO (7c), ESPORÂNGIO COM ZOÓSPOROS APRISIONADOS (APLANÓSPOROS) QUE FORMARAM CÉLULAS VEGETATIVAS PEQUENAS (7b), ESPORÂNGIO LIBERANDO ZOÓSPOROS (7a). EXTRAÍDO DE AHMADJIAN, 1993.

A morfologia apresentada pelo fotobionte de *T. flavicans* sugere que esta alga possa estar muito próxima das espécies *T. galapagensis* e *T. higginsiae*. O cloroplasto grande em forma de estrela, a presença de um pirenóide circundado por uma bainha de amido, são caracteres comuns a essas espécies. Segundo os autores que descreveram as espécies (HILDRET & AHMADJIAN, 1981), as diferenças básicas entre elas são:

- *Trebouxia galapagensis*: Coloração da colônia: verde escuro, bainha de amido semicontínua em volta do cloroplasto e cloroplasto distinguível.
- *Trebouxia higginsiae*: Coloração da colônia verde claro; bainha de amido contínua em volta do cloroplasto e cloroplasto indistinguível.

Posteriormente a isso Friedl (1989) fundamentado na ultra-estrutura do pirenóide, afirma que *T. galapagensis*, *T. higginsiae*, juntamente com *T. corticola* e *T. usnea* apresentam a mesma estrutura de pirenóide (figura 2.6) e poderiam representar uma única espécie.

Mais recentemente, HELMS e colaboradores (2001), demonstraram através de análise molecular que as culturas de *T. galapagensis* e *T. higginsiae*, apresentam a mesma sequência ITS rDNA, e apenas estas duas espécies poderiam ser agrupadas em uma mesma espécie.

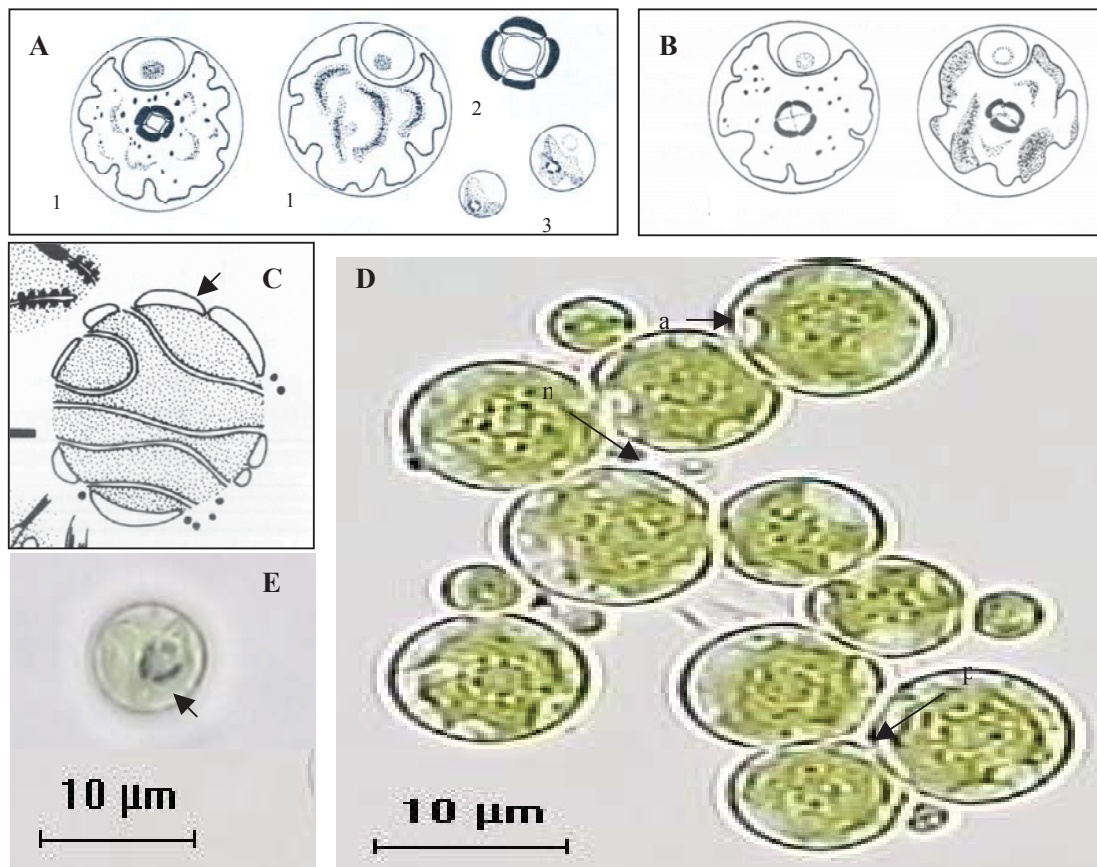
No caso do estudo de fotobiontes de líquens, alguns autores descreveram novas espécies a partir de uma única linhagem isolada, desprezando possíveis variações morfológicas comuns em algas, como é o caso de *T. galapagensis* (UTEX 2232) e *T. higginsiae* (UTEX 2230).

Isto posto crê-se que a descrição do fotobionte de *T. flavicans* como uma nova espécie, não seja apropriada no momento, pela carência de dados para fazê-lo. Outras culturas filogeneticamente relacionadas com este fotobionte, são necessárias para a verificação de possíveis variações da espécie. Além disso, uma análise ultra-estrutural se faz extremamente necessária. Estudo este que já está em andamento, no Depto de Ciências Vegetais da Karl-Franzens Universität (Graz, Áustria), sob responsabilidade do o Prof. Dr. Gunther Zelnik.

Para a obtenção de biomassa de algas, extração e análises de seus polissacarídeos, o fotobionte de *T. flavicans* foi desenvolvido em meio TM líquido, sob agitação constante. Após 30 dias de cultivo as células foram filtradas ou centrifugadas e a massa de células

lavada com água destilada, foi posteriormente liofilizada. Após 20 litros de cultivo, o rendimento obtido foi de 53 g de material liofilizado, o que corresponde a um rendimento de 2,65 gramas de alga por litro de meio.

FIGURA 2.6: ESTRUTURA DOS FOTOBIONTES *T. higginsiae* E *T. galapagensis*.



- A) DESENHO ESQUEMÁTICO DE *Trebouxia higginsiae*: 1 – CÉLULAS VEGETATIVAS; 2 – ESTRUTURA DO PIRENÓIDE; 3 – AUTÓSPÓROS (ETTL & GÄRTNER, 1995).
 B) DESENHO ESQUEMÁTICO DE CÉLULAS VEGETATIVAS DE *Trebouxia galapagensis* (ETTL & GÄRTNER, 1995).
 C) ULTRAESTRUTURA DO PIRENÓIDE (TIPO CORTÍCOLA): SETA INDICA A BAINHA DE AMIDO (FRIEDL, 1989).
 D) FOTOBIONE ISOLADO DE *T. flavicans*: A – AUTÓSPORO; N – NÚCLEO PRESENTE EM INVAGINAÇÃO DO CLOROPLASTO; P – PIRENÓIDE, COM BAINHA DE AMIDO.
 E) FOTOBIONTE DE *T. flavicans* CORADO COM LUGOL; SETA INDICA BAINHA DE AMIDO. .
 AUMENTO: 1000X

2.4.2. Isolamento e cultivo de simbiontes líquênicos

Após o isolamento e cultivo dos simbiontes de *T. flavicans*, outras espécies de líquens foram submetidas ao isolamento de seus simbiontes. Buscou-se adotar alguns critérios para a seleção dos simbiontes.

Para os micobiontes, primeiramente por esporos, buscou-se isolar aqueles que a literatura apresenta como de isolamento mais fácil e crescimento rápido. Micobiontes da família Physciaceae foram selecionados por apresentarem esporos escuros, o que facilitaria o seu isolamento. Desta maneira foram selecionados para o isolamento os líquens *Physcia aipolia* (natural de regiões temperadas) e *Physcia atrostriata* (típica de regiões tropicais). Além de Physciaceae, outro táxon escolhido foi a família Teloschistaceae, desta família foram escolhidos os líquens *Teloschistes flavicans*, *T. exilis* e *Xanthoria parietina*. Os micobiontes da família Teloschistaceae são descritos na literatura por apresentarem um bom crescimento em cultivo (HONNEGER et al., 2004).

Para o isolamento dos fotobiontes os líquens foram selecionados de acordo com a posição de seus fotobiontes nas árvores filogenéticas, apresentadas no capítulo 1. Os líquens selecionados, em geral apresentavam fotobiontes que poderiam representar novas espécies, carecendo assim de uma descrição morfológica, além da caracterização filogenética. Na tentativa de isolamento dos fotobiontes pelo método de fragmentação de talo (Yamamoto et al., 1985), os micobiontes destes líquens foram também submetidos ao mesmo processo de isolamento.

A tabela 2.2 foi desenvolvida seguindo um modelo publicado por CRITTENDEN et al. (1995). Neste trabalho os autores listam todos os líquens submetidos a um processo de isolamento e apresentam os resultados obtidos da seguinte maneira: como sucesso no isolamento e desenvolvimento das culturas (S), ou um insucesso. Quando o cultivo falha, ele é justificado pelas seguintes razões: não houve ejeção dos esporos (E); não houve desenvolvimento das colônias (D), seja dos fragmentos ou esporos ejetados; o alto teor de contaminação (C) impediu o desenvolvimento das colônias.

A tabela mostra que dos 17 líquens submetidos ao processo de isolamento, foi obtido sucesso em 7 micobiontes e 7 fotobiontes. As culturas destes simbiontes encontram-se no Laboratório de Química de Carboidratos da UFPR. Os insucessos obtidos, em

tentativas de fragmentos de talo, devem-se principalmente aos altos teores de contaminação encontrados.

TABELA 2.2. : RESULTADOS DO PROCESSO DE ISOLAMENTO DE SIMBIONTES DE LIQUENS.

Líquen	*Nº amostra	Micobionte						Fotobionte				
		Esp.				Frag			Frag			
		S	E	D	C	S	D	C	S	D	C	
<i>Cladia aggregata</i>	R 152										X	
<i>Cladonia ceratophylla</i>	R 136					X					X	
<i>Cladonia</i> sp.	R 137					X					X	
<i>Heterodermia cesarettiana</i>	R 8						X	X			X	X
<i>Physcia aipolia</i>	M 1	X										
<i>Physcia atrostriata</i>	R 4			X			X	X			X	X
<i>Physcia sinuosa</i>	R 1						X	X			X	X
<i>Physconia distorta</i>	M 2		X									
<i>Pyxine</i> sp.	R 5						X	X			X	X
<i>Ramalina anceps</i>	R 78						X				X	
<i>Ramalina celastri</i>	R 74						X	X	X			
<i>Ramalina peruviana</i>	R 67					X					X	
<i>Siphula pteruloides</i>	M 3					X					X	
<i>Stereocaulon</i> sp.	R 135										X	X
<i>Teloschistes exilis</i>	R 54		X									
<i>Teloschistes flavicans</i>		X										
<i>Xanthoria parietina</i>	M 4	X										

*): número amostra, baseada na extração de DNA.

Esp: Metodologia de isolamento baseada em germinação de esporos.

Frag: Metodologia de isolamento baseada em fragmentos de talo.

S: sucesso no isolamento

E: não ejeção de esporos (falhou)

D: Não houve Desenvolvimento (germinação dos esporos) – (falhou)

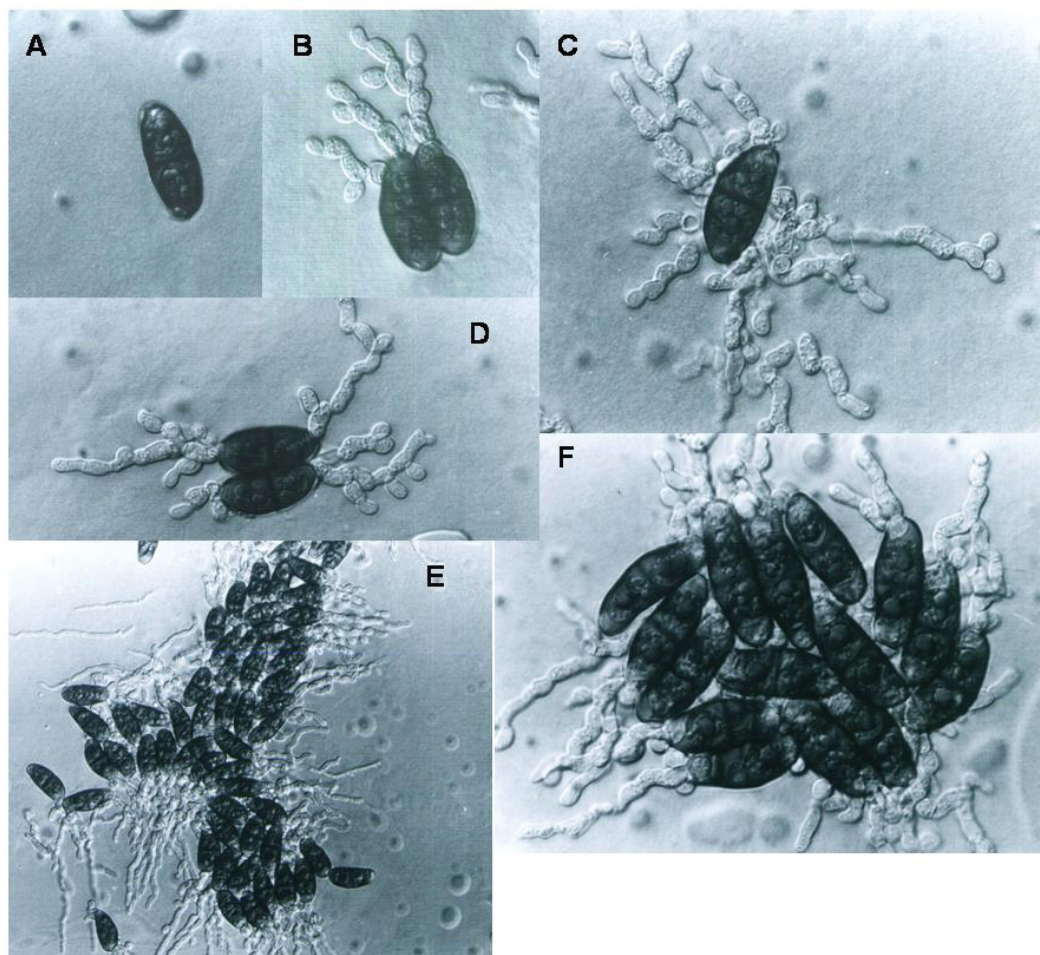
C: Alto teor de contaminação (falhou)

As figuras 2.7 e 2.8 apresentam o processo de isolamento, através de esporos, dos micobiontes dos líquens *Phycia aipolia* e *Xanthoria parietina* respectivamente. Os esporos de ambos os líquens germinaram em 4 dias após a ejeção (figuras 2.7 e 2.8) e com 30 dias os micélios recém germinados foram transferidos para tubos contendo meio orgânico no intuito de se obter colônias desenvolvidas.

Os esporos dos micobiontes de *Xanthoria parietina* (figura 2.8) e *Teloschistes flavicans* (Figura 2.4) são ejetados em um asco (pacote) contendo 8 esporos. Para *X. parietina* são observados 8 esporos germinando juntos, e sem diferenças de velocidades de desenvolvimento aparentes. Este dado corrobora os obtidos por HONNEGER e colaboradores (2004) ao afirmarem que os esporos de *X. parietina* apresentam um desenvolvimento similar em cultura, o que caracteriza a espécie como homotática. Já na figura 2.4.a, observa-se que os oito esporos de *T. flavicans* apresentam um desenvolvimento diferenciado, sendo que alguns se apresentam imaturos. Este fato sugere que *T. flavicans* possa apresentar um talo heterotático. Entretanto uma análise molecular se faz necessária para comprovar este resultado.

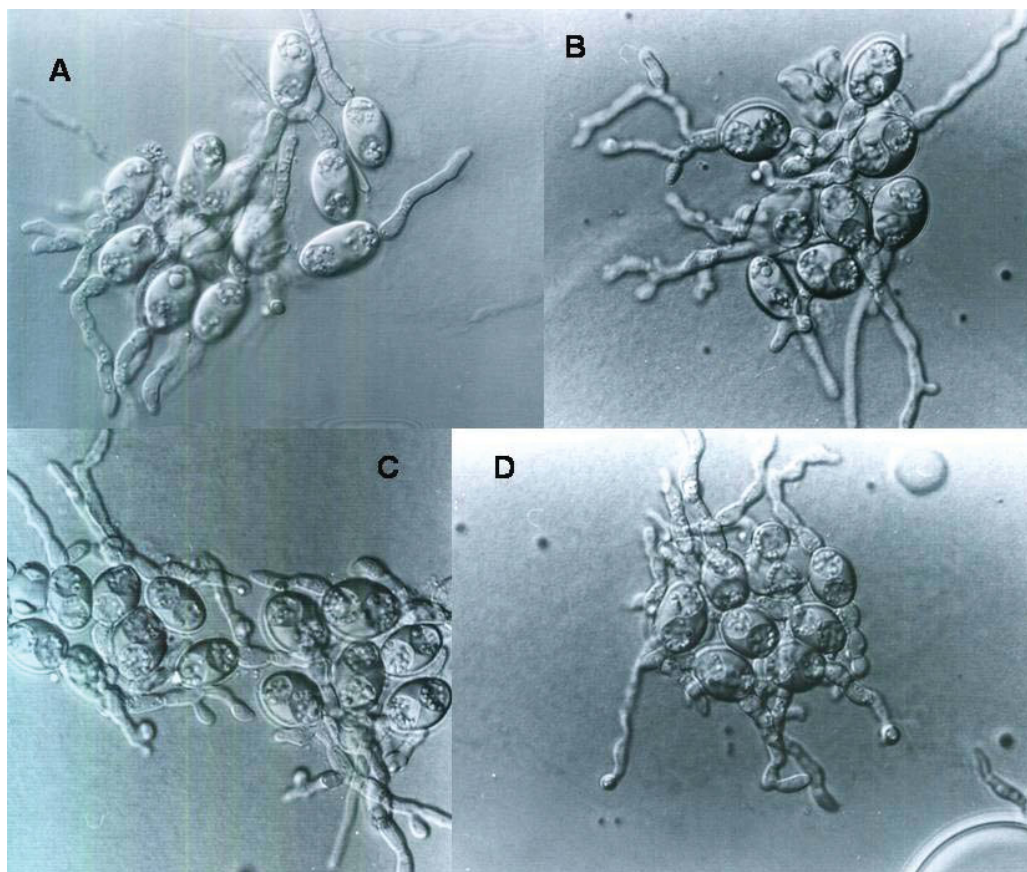
Na figura 2.9 são observados os tubos contendo as colônias desenvolvidas dos micobiontes dos líquens *Xanthoria parietina* e *Teloschistes flavicans*, originados pela metodologia de esporos, e *Cladonia ceratophylla*; *Cladonia sp* (R137); *Ramalina peruviana*, e *Siphula pteruloides*, isolados pela metodologia de fragmento de talo. Além disto são observadas as placas do cultivo de *T. flavicans* apresentando as colônias maduras e em desenvolvimento. As figuras 2.9(A) e 2.9 (I) apresentam um tubo e uma placa com o desenvolvimento de ambos os simbiontes de *Cladonia sp.* (R137) e *Cladonia ceratophylla* respectivamente.

FIGURA 2.7: GERMINAÇÃO DE ESPOROS E DESENVOLVIMENTO DO MICÉLIO DO MICOBIONTE DE *Physcia aipolia*



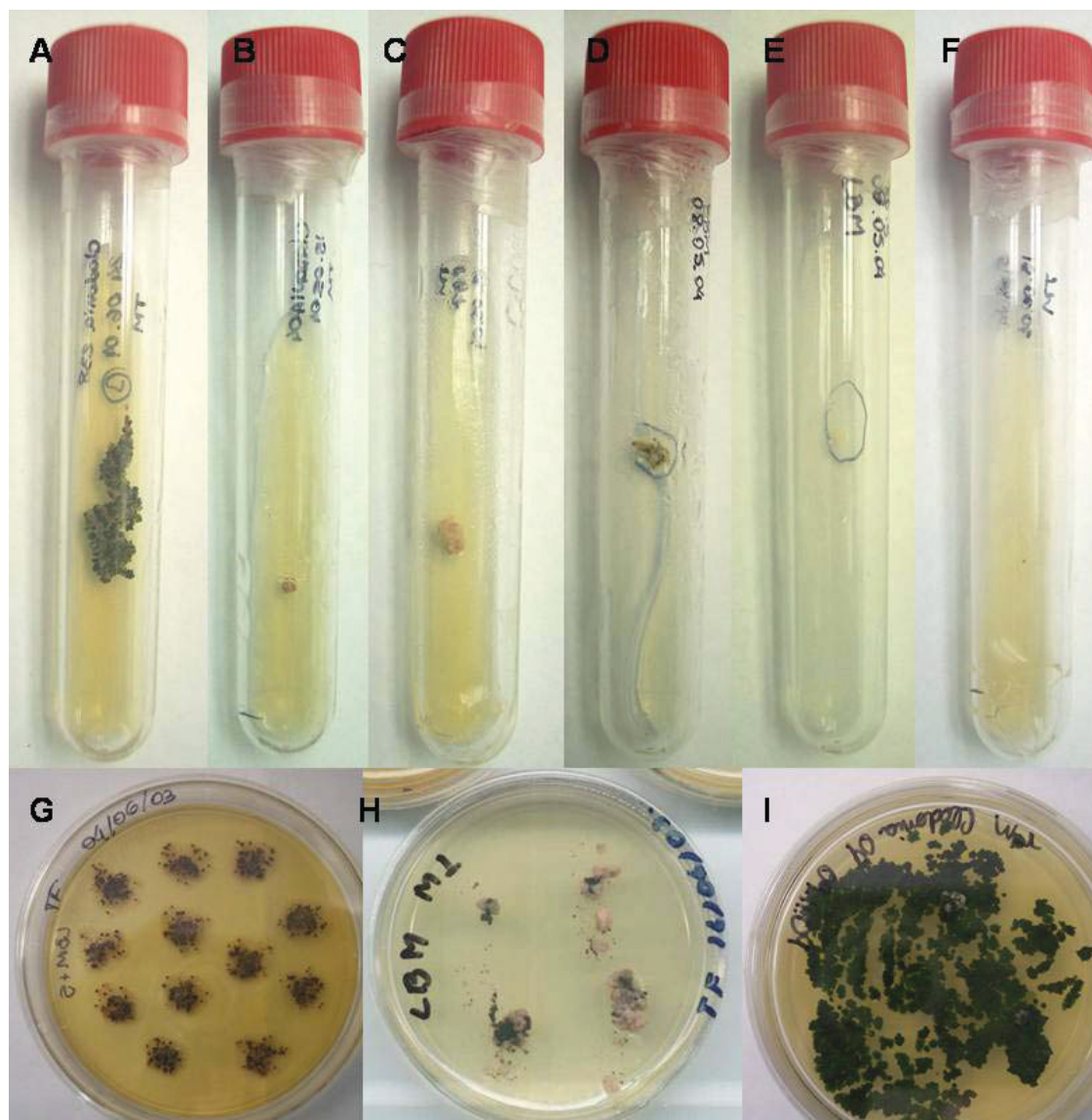
A) ESPORO, B) ESPORO GERMINANDO COM 4 DIAS. C E D) ESPOROS COM 11 DIAS. E E F) MICÉLIO EM INÍCIO DE DESENVOLVIMENTO COM 20 DIAS. AUMENTO 1000X.

FIGURA 2.8: GERMINAÇÃO DE ESPOROS E DESENVOLVIMENTO DO MICÉLIO DO MICROBIONTE DE *Xanthoria parietina*.



A E B) ESPOROS GERMINANDO COM 4 DIAS. C E D) ESPOROS COM 11 DIAS. AUMENTO 1000X.

FIGURA 2.9: COLÔNIAS DE MICOBIONTES



A) *Cladonia* SP. 137 (CONTAMINADA COM FOTOBIONTE; B E I) *Cladonia ceratophylla* (I –CONTAMINADA COM FOTOBIONTE); C) *Ramalina peruviana*; D, G E H) *Teloschistes flavicans*; E) *Xanthoria parietina*; F) *Siphula pteruloides*.

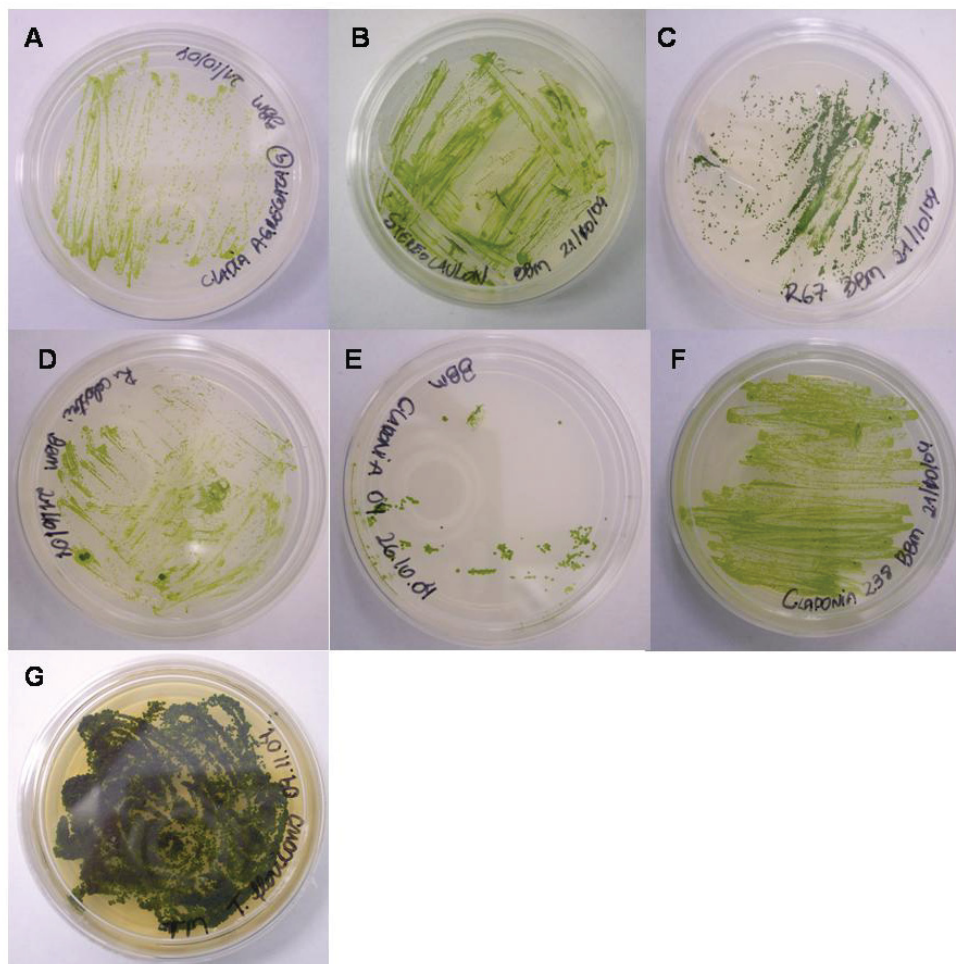
Os líquens *Ramalina celastri*, *R. peruviana*, *Telsochistes flavicans*, *Cladonia ceratophylla*, *Cladonia* sp. (R137), *Cladia agregatta*, *Siphulla pteruloides*; *Stereocaulon* sp. tiveram seus fotobiontes isolados com sucesso. As placas contendo os fotobiontes isolados estão demonstradas na figura 2.10.

A figura 2.11 apresenta uma análise preliminar da morfologia da cultura dos fotobiontes isolados dos líquens *Cladonia ceratophylla*; *Cladonia* sp. (R137) e *Cladia agregatta*. A análise das regiões ITS rDNA destas algas indicam que estas são pertencentes ao gênero *Asterochloris* (*sensu* Rambold et al., 1998). No ciclo de vida destes fotobiontes foi observado somente a presença de zoosporângios e aplanosporos, não sendo observada a presença de autosporângios ou autósporos. As algas do gênero *Asterochloris* caracterizam-se por não apresentarem autósporos, somente zoósporos, que se desenvolvem em aplanósporos como estruturas de reprodução.

A figura 2.12 apresenta o ciclo de vida dos fotobiontes isolados dos líquens *Ramalina peruviana*, *R. celastri* e *Teloschistes flavicans*. Podemos observar que a cultura do fotobionte de *R. peruviana* [figuras 2.12(A) e 2.12(B)] não se encontra pura. A presença de hifas, provavelmente do micobionte faz com as células apresentem um formato diferente do comumente observado para *Trebouxia*. Pode-se observar o pireníode, com sua bainha de amido, porém o cloroplasto é indistinguível.

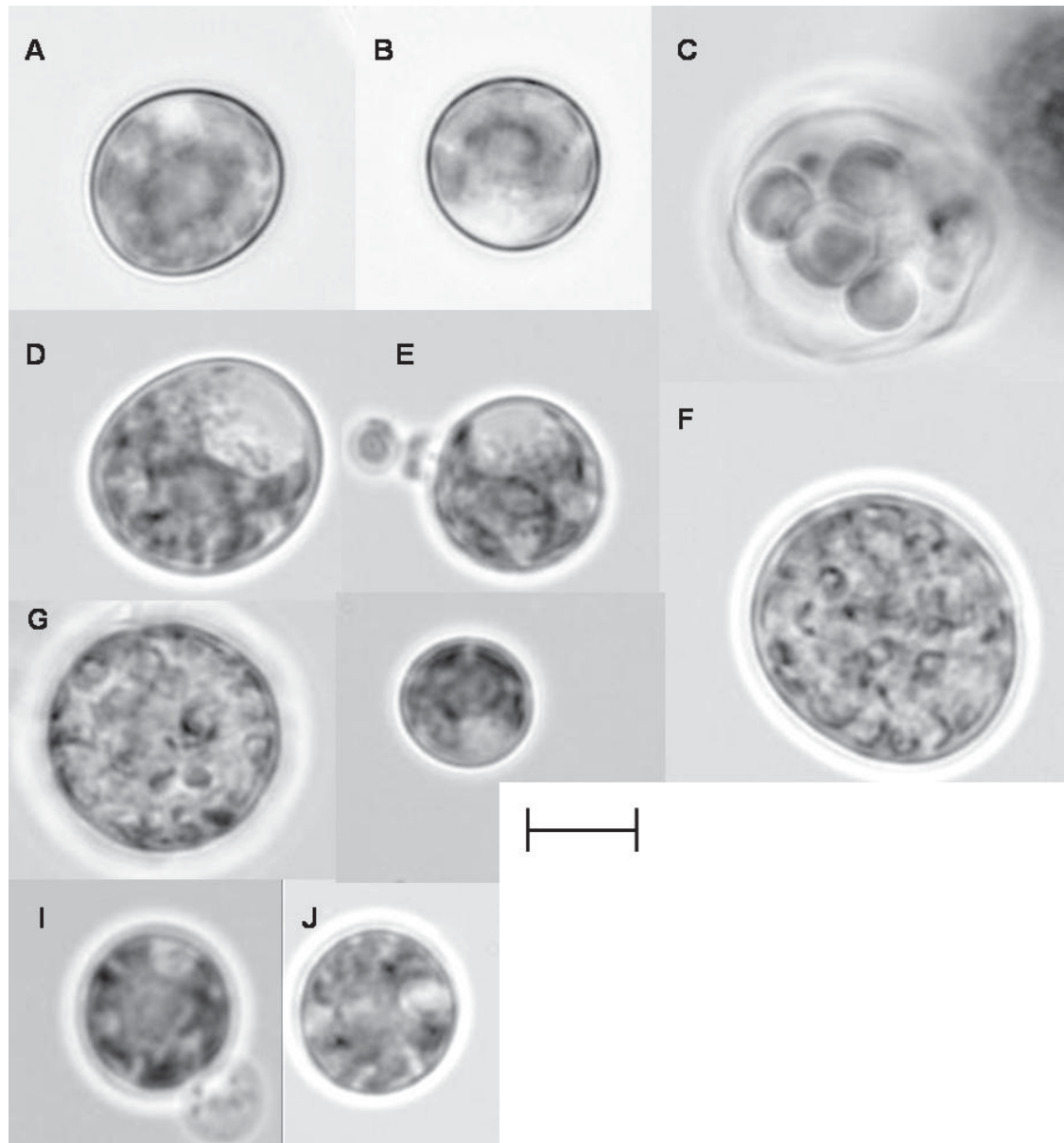
A figura 2.12 (C) nos permite observar o cloroplasto em forma de estrela do fotobionte de *Teloschistes flavicans*, bem como o núcleo e nucléolo. A grande diferença do ciclo de vida de *Trebouxia* e *Asterochloris* é a presença de autósporos no ciclo de vida de *Trebouxia*. Nas figuras 2.12(F) e 2.12(G) podemos observar um autosporângio e outro onde o autósporo está sendo liberado.

FIGURA 2.10: CULTURAS DE FOTOBIONTES ISOLADOS.



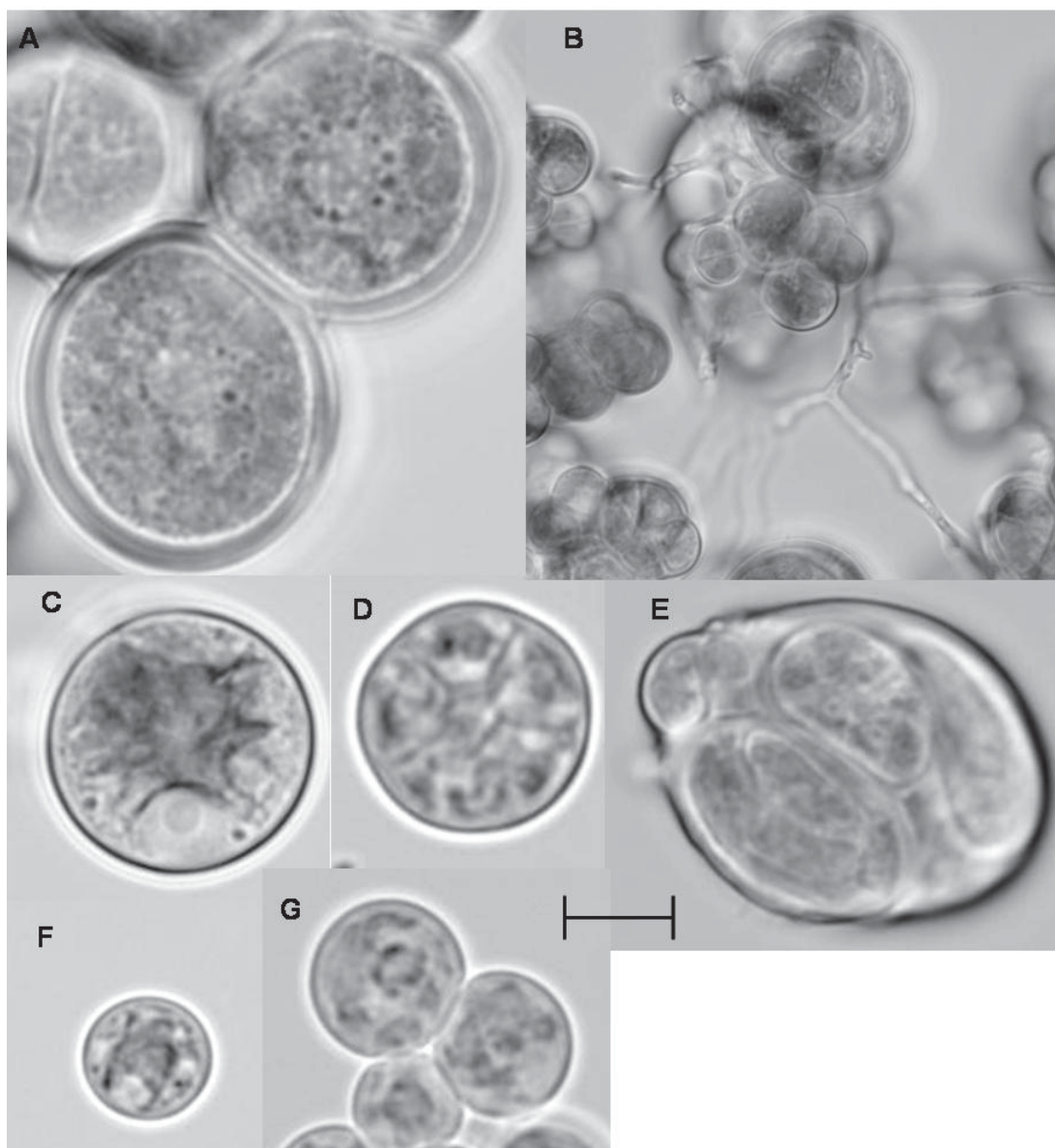
A) *Cladia aggregata*; B) *Stereocaulon* sp.; C) *Ramalina peruviana*; D) *Ramalina celastri*; E) *Cladonia ceratophylla*; F) *Cladonia* sp. 137(238); G) *T. flavicans*

FIGURA 2.11: FOTOBIONTE *Asterochloris*



DIVERSOS ESTÁGIOS DO CICLO DE VIDA DE *Asterochloris*.
 A-D) *Cladonia ceratophylla*; E-G) *Cladonia* SP. 137; H-J) *Cladia aggregata*
 ESCALA: 10 μ M. AUMENTO 1000X.

FIGURA 2.12: FOTOBIONTE *Trebouxia*



DIVERSOS ESTÁGIOS DO CICLO DE VIDA DE *TREBOUXIA*.

A-B, G) *Ramalina peruviana*; C) *T. flavicans*; D-F) *Ramalina celastri*

EM (B) OBSERVA-SE A PRESENÇA DE HIFAS ORIGINADAS DO MICROBIONTE
ESCALA: 10 μ m. AUMENTO 1000X.

2.5. Conclusões

A partir dos resultados apresentados no Capítulo pode-se concluir que:

- Os simbiontes do líquen *Teloschistes flavicans* foram isolados com sucesso;
- A metodologia de isolamento por esporo apresentou sucesso para o micobionte dos líquens *Teloschistes flavicans* e *Xanthoria parietina*;
- A metodologia de isolamento de micobiontes por fragmentos de talo foi bem sucedida para os líquens *Cladonia ceratophylla*, *Cladonia* sp. (137), *Ramalina peruviana* e *Siphula pteruloides*;
- A metodologia de fragmentos de talos para o isolamento de fotobiontes foi bem sucedida para os líquens *Cladonia ceratophylla*, *Cladonia* sp. (137), *Ramalina peruviana* e *Cladia aggregata* e *Ramalina celastri*.

Capítulo 3: Análise de ácidos graxos do líquen Teloschistes flavicans e seus biontes isolados.

3.1. Introdução

A composição de ácidos graxos de líquens foi primeiramente determinada por SCHLENK & GELLERMAN (1965), ao observarem que os líquens *Evernia mesomorpha* e *Parmelia* sp. apresentaram os ácidos linoleico e oléico como os principais ácidos graxos constituintes. Estes mesmos autores sugerem que a presença em menores concentrações de ácido linolênico, comum de algas e plantas superiores, era proveniente do parceiro fotossintetizante.

A partir do início da década de 90 o grupo chefiado pela pesquisadora Valery Dembitsky descreveu a composição de ácidos graxos para vários fungos liquenizados (DEMBITSKY et al., 1991a; 1992a; 1994a; 1994b). Os autores utilizaram a fragmentação de massa (acoplada a cromatografia gasosa, GC-MS) como ferramenta para a identificação dos ácidos-graxos. Entre os líquens estudados estão espécies dos gêneros *Cladonia*, *Peltigera*, *Pseudoevernia* (DEMBITSKY et al., 1991a, 1992b), bem como *Parmelia* (DEMBITSKY et al., 1991a, 1992a). Os resultados demonstraram os ácidos palmítico, esteárico, oléico, linoleico como principais ácidos graxos, porém um grande número de outros ácidos graxos foi detectado em menores proporções.

Um estudo no Laboratório de Química de Carboidratos de UFPR utilizou a composição de ácidos graxos de líquens como um possível caráter taxonômico. O trabalho apresentou o cuidado de trabalhar com líquens da mesma região, ou seja, sob o mesmo estresse ambiental. O trabalho mostrou que esta composição pode ser usada como possíveis marcadores taxonômicos, da mesma maneira que é observado em fungos (SASSAKI et al., 2001; SASSAKI, 2002).

Mudanças na composição de ácidos graxos são reconhecidamente observadas como uma resposta a variações ambientais. Em geral, quando uma diminuição de temperatura do meio é observado, aumentam-se os teores de ácidos graxos insaturados neste organismo. A resposta resultante levaria a um aumento da fluidez de membrana, compensando a queda de temperatura (WASSEF, 1977; TULLOCH, 1990). Desta maneira a partir de 1994 iniciaram

os estudos buscando analisar como as variações ambientais sazonais (altitude, temperatura, sazonalidade) influenciam o fenótipo resultante de ácidos graxos (DEMBITSKY et al., 1994a; b; PIERVITTORI et al., 1994; 1995).

Estudos envolvendo os líquens *Xanthoria parietina* e 3 espécies do gênero *Physcia* demonstraram que o teor de ácidos graxos insaturados diminui com o aumento da temperatura, confirmando a tendência observada para outros organismos (DEMBITSKY et al., 1994a; b). Entretanto estudos realizados por PIERVITTORI e colaboradores (1994; 1995) demonstraram uma situação contrária daquela anteriormente observada (DEMBITSKY et al., 1994a; b). Esses autores observaram que o teor de ácidos graxos insaturados diminui em altas altitudes, o que corresponderia a menores temperaturas (PIERVITTORI et al., 1994). Além disso, análises de *X. parietina* em altas altitudes (1300 m) apresentaram um maior teor de insaturação no verão, em maiores temperaturas e níveis de humidade. Embora estudos envolvendo líquens de regiões temperadas apresentem diferenças em relação a seus resultados, nada se sabe sobre o efeito de variações de temperaturas na composição de ácidos graxos em regiões tropicais.

Outros fatores como iluminação e fase de desenvolvimento do líquen parecem influenciar o conteúdo de ácidos graxos (BYCHEK & BYCHEK, 1996; BYCHEK et al., 1996). Estágios iniciais de desenvolvimento de *Umbilicaria virgins* apresentam um maior teor de ácidos graxos de cadeia longa e insaturados. A principal explicação e a utilização do poder redutor de ácidos graxos como reserva energética (BYCHEK et al., 1996). Outro estudo demonstrou que o líquen *Parmelia tictinta* quando submetido ao escuro aumentava o seu teor de ácidos graxos insaturados, em uma provável adaptação fotossintética (BYCHEK & BYCHEK, 1996), estes resultados foram também observados para a alga verde *Chlorella* sp. (NYUPPIEVA et al., 1980) .

O primeiro trabalho comparando as composições de ácidos graxos dos líquens e seus simbiontes isolados (fotobionte e micobionte) foi desenvolvido por YAMAMOTO e WATANABE, em 1974. Os líquens estudados *Ramalina yasudae* e *Cladonia mitis*, bem como seus biontes isolados apresentaram como principais componentes os ácidos oléico e palmítico. Além disto, menores concentrações de ácidos linoléico e araquidônico foram observados. BYCHEK-GUSCHINA (1997), sugere que a composição de ácidos graxos varia de acordo com a espécie e o principal fator que determina a sua composição nos simbiontes

isolados é a condição de cultivo. Outro estudo, para o líquen *Xanthoria parietina*, apresenta diferenças no teor de instauração (TORRES et al., 2003). Enquanto o fotobionte apresenta altos teores de ácidos graxos insaturados (como ácido oléico e linoléico), o micobionte apresenta os ácidos palmítico e esteárico como principais componentes.

Recentemente, MOLINA et al. (2003) estudando o líquen *Physconia distorta* e seu micobionte isolado sugeriram um íntimo relacionamento entre a síntese de metabólitos secundários e com a síntese de ácidos graxos. Os autores mostraram que o micobionte em cultivo em um meio enriquecido com glucose apresenta altos teores de ácidos graxos, em contrapartida uma diminuição de metabólitos secundários é observada. Segundo estes autores este comportamento pode ser explicado através das diferentes fontes de carbono, e suas concentrações, disponíveis no líquen e seu micobionte em cultura. Ainda, fungos liquenizados utilizam como principal fonte de carbono o ribitol sintetizado pela alga. No fungo este é rapidamente transformado em manitol (RICHARDSON et al., 1967) e utilizado nas vias metabólicas. Em contrapartida, em cultivo, o micobionte utiliza um meio com 4% de glucose. Em um meio que utiliza glucose como fonte carbono espera-se que a concentração de NAD(P)H no micélio seja alta, principalmente como consequência do metabolismo oxidativo da glucose. Desta maneira a reciclagem necessária do NAD(P) é providenciada por um favorecimento da via que utiliza a ácido graxo sintase. Em contrapartida, no talo liquênico o poder redutor necessário é muito menor, favorecendo a via de síntese de compostos aromáticos.

Embora alguns experimentos tenham sido sugeridos, ainda não se tem relato na literatura de como a presença de polióis, principal fonte de carbono transportada do fotobionte para o micobionte, pode interferir na composição de ácidos graxos e metabólitos secundários do micobionte isolado.

3.2. Objetivos

3.2.1. Objetivo geral

Determinar a composição de ácidos graxos do líquen *Teloschistes flavicans* e comparar com a de seus simbiosites isolados

3.2.2. Objetivos específicos.

- Determinar a composição de ácidos graxos do líquen *Teloschistes flavicans*.
- Comparar a composição do líquen com a de seus simbiosites isolados.
- Verificar possíveis efeitos da sazonalidade e temperatura na composição de ácidos graxos de *Teloschistes flavicans*.
- Verificar possíveis efeitos do meio de cultura e temperatura sobre o micobionte de *Teloschistes flavicans*.

3.3. Material e Métodos

3.3.1. Coleta e manipulação do material liquênico.

Espécimes de *Teloschistes flavicans* foram coletadas em árvores de restinga na Ilha do Mel, Pontal do Paraná – Brasil (25° 32'05" Sul/ 48° 20' 30" Oeste). Coletas foram desenvolvidas nos meses de fevereiro (verão) e agosto (inverno) de 2003. As amostras dos líquens em estudo estão depositadas no herbário da UFPR (UPCB).

As temperaturas médias do local de coleta apresentadas no trabalho foram obtidas no site:

http://www.iapar.br/Sma/Cartas_Climaticas/Temperatura.htm.

O primeiro passo para se analisar diferentes partes do talo liquênico comparativamente foi a dissecação manual do talo. As partes selecionadas foram: Líquen intacto (LI), apotécio (A), líquen sem apotécio (LSA), bem como o micobionte isolado (MI) e o fotobionte crescido em dois diferentes meios de cultura, Meio Trebouxia (F TM) e Meio basal de Bold's (F BBM).

3.3.2. Isolamento do micobionte e fotobionte

O isolamento do micobionte e fotobionte foram desenvolvidos de acordo com as metodologias descritas no capítulo 2.

3.3.2.1. Condição de cultivo do micobionte e fotobionte.

O cultivo dos simbiontes apresentou, especificamente para o estudo de ácidos graxos, algumas variações com relação à metodologia descrita no Capítulo 2.

3.3.2.2 Fotobionte:

O cultivo do fotobionte foi desenvolvido em cultura líquida, estática, durante 30 dias nos meios BBM e TM (Material e Métodos). Os cultivos foram desenvolvidos em duas temperaturas distintas: 22 e 27 °C, ambas com fotoperíodo de 12h luz/ 12h escuro.

3.3.2.3. *Micobionte:*

O cultivo dos micobiontes foi diferenciado de acordo com o experimento em questão. Para o experimento de comparação dos ácidos graxos do líquen com seus simbiontes as condições foram as mesmas descritas para o fotobionte, ou seja:

Cultura em placa, utilizando o meio de cultura LBM. Duas condições de temperatura: 22 e 27 °C, ambas com fotoperíodo de 12h luz/ 12h escuro.

Para o experimento de análise comparativa de ácidos graxos em diferentes condições de cultivo as condições serão descritas abaixo.

3.3.3. *Análise comparativa dos ácidos graxos em diferentes condições de cultivo.*

Para este experimento quatro condições de cultivo foram utilizadas levando em consideração o fotoperíodo e o tempo de cultivo. As condições de cultivo podem ser numeradas como:

1 → 3 meses de cultivo: 12h luz/ 12h escuro

2 → 6 meses de cultivo: 12h luz/ 12h escuro

3 → 3 meses de cultivo: 24h luz/ 0h escuro

4 → 6 meses de cultivo: 24 luz/ 0h escuro

Além de diferentes condições de cultivo foram utilizados também diferentes meios de cultura. Estes meios foram confeccionados através de modificações de meios já descritos na literatura (ver Capítulo 2), com variação de fontes de carbono e nitrogênio. Os diferentes meios utilizados estão na tabela 3.2.

3.3.4. *Extração e análise de ácidos graxos*

Os ácidos graxos foram extraídos e analisados de acordo com Sasaki e colaboradores (2001). Cada amostra (30 mg) foi extraída com uma mistura clorofórmio-metanol (2:1 v/v, 9 ml) a 80 °C por 2 horas. Este procedimento foi repetido três vezes. Para as análises da composição de ácidos graxos, o extrato (10mg) foi metanolisado com uma solução de HCl em metanol (3%) a 80°C por duas horas. Os ácidos graxos metil-ésteres (AGME) foram extraídos do metanol com n-hexano e analisados por GC-MS utilizando o comatógrafo gasoso Varian 3800 ligado a um espectômetro de massa Varian ion trap,

modelo 2000R. Misturas de AGME foram analisadas comparando-se seus valores de R_f e seus perfis de EI-MS com padrões de AGME (Sigma Co.), utilizando uma coluna capilar DB-225 (30 m x 0,25 mm d.i.), apresentando a seguinte programação de rampa de temperatura: a) 50 °C a 180 °C (40 °C.min⁻¹), mantida por 5 minutos e b) 180 °C a 200 °C (40 °C.min⁻¹), mantida constante até o final de cada análise, com duração de 30 minutos.

3.4. Resultados e Discussão

A composição de ácidos graxos produzidos pelas culturas do fotobionte, *Trebouxia* sp., e do micobionte, bem como diferentes porções do líquen *T. flavicans* foram analisados por GC-MS. O fotobionte foi cultivado em dois diferentes meios de cultura, TM e BBM, os quais diferem pela fonte de carbono e nitrogênio orgânicos. Para o micobionte as culturas foram desenvolvidas a 22 e 27 °C. No intuito de se detectar uma possível variação sazonal amostras foram coletadas durante o verão (fevereiro) e inverno (agosto) de 2003. Os resultados obtidos são apresentados na tabela 3.1.

O rendimento do extrato clorofórmio-metanol não apresentou grandes diferenças em relação às estações nas maiorias das frações estudadas. Entretanto o rendimento encontrado no apotécio durante o verão foi maior no inverno, este dado é provavelmente em consequência a alta quantidade de metabólitos secundários presentes. Estudos sugerem que raios ultravioleta (tipo UV-B) podem induzir a produção de metabólitos secundários, entre eles a parietina, principal metabólito secundário encontrado em *T. flavicans* (SOLHAUG et al., 2002). Desta maneira, durante o verão, uma maior incidência de raios ultravioleta (UV-B) poderia justificar um maior rendimento do extrato clorofórmio-metanol.

A composição de ácidos graxos varia de acordo com a estação e suas conseqüentes temperaturas (tabela 3.1). Os ácidos graxos palmítico e esteárico foram os mais abundantes em fevereiro, durante o verão, quando a média de temperatura foi cerca de 23°C. Todavia no inverno (agosto), sendo a média de temperatura 18°C, observou-se um aumento de ácidos graxos insaturados como ácido oléico e linoléico. Não foram observadas alterações no apotécio do líquen.

Até o momento todos os estudos desenvolvidos com variação da composição de ácidos graxos devido a variações de temperatura são relacionados com líquens oriundos de regiões temperadas, onde a amplitude térmica observada é extremamente alta. DEMBITSKY et al. (1994a), por exemplo, observaram uma diminuição no teor de ácidos graxos insaturados de *Xanthoria parietina* e três espécies do gênero *Physcia* quando estes foram submetidos a uma variação de temperatura de -7°C a 23°C em apenas três meses. Os dados demonstraram que, mesmo em ambientes tropicais, com variações de somente cinco graus em duas estações bem delimitadas, o aumento da insaturação de ácidos graxos está

relacionado com o decréscimo da temperatura. Já foi sugerido que em plantas, uma mudança no metabolismo de lipídeos, em especial de ácidos graxos, seria uma adaptação às baixas temperaturas, em que um aumento nos níveis de ácidos graxos insaturados resulta em um aumento da fluidez de membrana. (DEMBITSKY et al., 1994a; b; WASSEF, 1977; TULLOCH, 1990).

Quando o micobionte foi crescido em diferentes temperaturas, a mesma resposta foi observada. Ácidos graxos insaturados compreendem 52 % do total de ácidos graxos em culturas desenvolvidas a 22 °C, enquanto que a 27 °C este percentual diminui para 28 %. Devido à impossibilidade dos fotobiontes de se desenvolverem a 27 °C, não foi possível determinar nenhuma diferença nas culturas de *Trebouxia* sp.

Quando comparados estes resultados com os da literatura, fica evidente que no líquen tropical *T. flavicans* uma menor variação térmica apresenta um grande efeito no metabolismo de ácidos graxos (figura 3.1). Em um aumento de temperatura de 5 °C, os ácidos graxos saturados de *T. flavicans* aumentaram de 40 % para 95 %. Em contraste, em *Xanthoria parietina*, um líquen da mesma família (Teloschistaceae) oriundo de zonas temperadas, um aumento de 30 °C elevou o teor de ácidos graxos saturados de 32 % para apenas 40 % (DEMBITSKY et al., 1994a).

Outros autores observam ainda uma diminuição do teor de ácidos graxos insaturados com uma diminuição de temperatura, o que resultaria em uma menor fluidez de membrana em temperaturas mais baixas (PIERVITTORI et al, 1994; 1995). Quais outros fatores, além da temperatura, poderiam estar relacionados com esse comportamento? As temperaturas observadas no inverno de regiões temperadas, geralmente são inferiores a 0°C, ou seja, a água presente não está disponível na forma líquida, caracterizando uma situação de dessecação, ou estresse osmótico. Estudos com *Saccaromyces cerevisiae* e outros fungos demonstram que em uma situação de estresse osmótico, ocorre um aumento na síntese do osmólito glicerol, uma molécula de trânsito livre pela membrana plasmática. No intuito de se reduzir esta permeabilidade, a célula altera os teores de esteróis e ácidos graxos insaturados de membrana (HOHNMANN, 2002).

Os resultados para o fotobionte apresentam um aumento no rendimento do extrato lipídico do meio TM em relação ao meio BBM. Este resultado pode ser considerado como

um aumento esperado, uma vez que o meio TM apresenta fontes orgânicas de nitrogênio e carbono. Desta maneira o resultado reflete em aumento de moléculas de reserva, como ácido palmítico e esteárico, bem como ácidos graxos de cadeia longa (tabela 3.1).

No intuito de investigar porções do talo contendo diferentes proporções de tecido fúngico comparou-se a composição de ácidos graxos do talo com seu apotécio. Entretanto não foram observadas diferenças, o que pode ser explicado pela morfologia do apotécio de *T. flavicans*, que é do tipo lecanórico, ou seja, a camada algal é presente também no apotécio. Quando analisado somente o disco do apotécio, ou seja, sem tecido proveniente da alga a detecção de ácidos graxos por GC-MS foi impossível, acreditamos que devido aos altos teores de metabólitos secundários presentes.

Os resultados aqui apresentados demonstram que mesmo em regiões tropicais, uma pequena variação de temperatura, como 5 °C, promove uma grande diferença nos teores de ácidos graxos em *T. flavicans*. O aumento de ácidos graxos insaturados encontrado em temperaturas menores é necessário para manter um nível similar de fluidez de membrana nestas condições ambientais. Observou-se também que a somatória da composição dos ácidos graxos dos simbiontes liquênicos, em cultura, não correspondem ao líquen total. Este comportamento já havia sido anteriormente observado para os líquens *Evernia mesomorpha* e *Parmelia* sp. (YAMAMOTO & WATANABE, 1974), *Parmelia carperata* e *Ascomarpha fuscata* (BYCHEK-GUSCHINA, 1997) e *Xanthoria parietina* (TORRES et al., 2003) e pode representar duas explicações: i) As vias envolvidas no metabolismo de ácidos graxos são fortemente afetadas pela simbiose liquênica. ii) As respostas fisiológicas observadas *in vivo* são muito diferentes daquelas observadas *in vitro*.

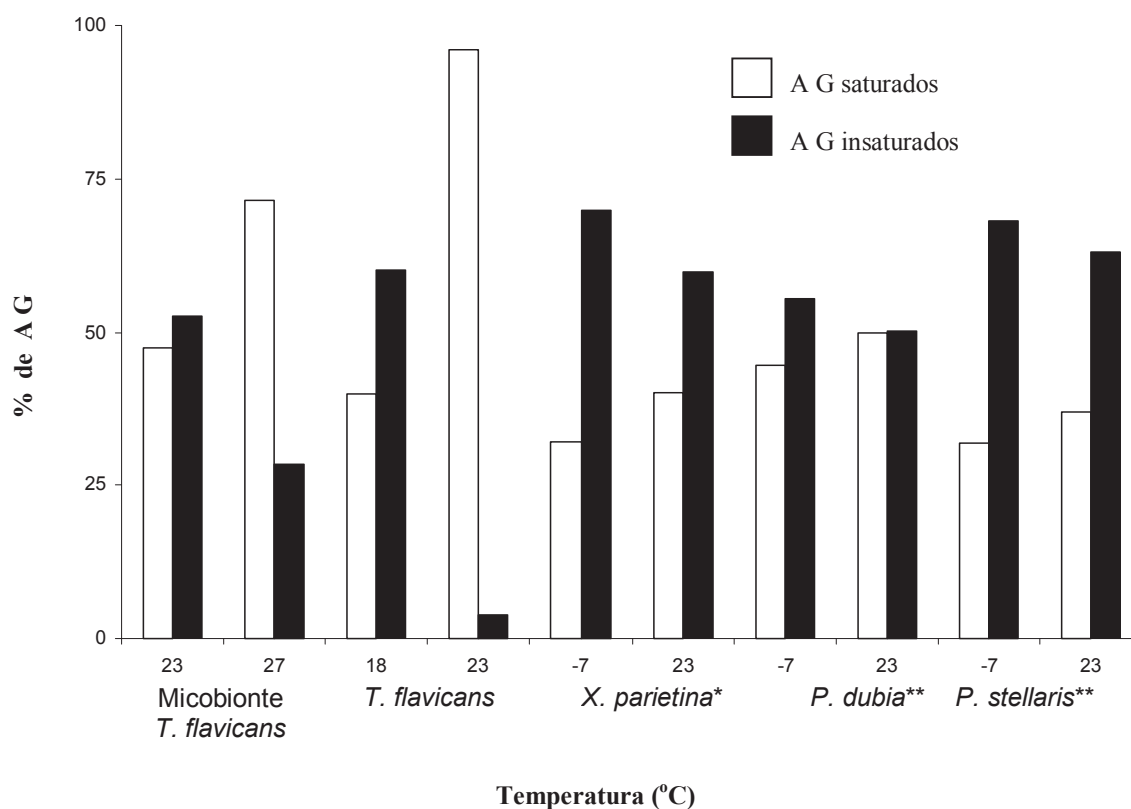
TABELA 3.1: ÁCIDOS GRAXOS METIL-ÉSTERES (AGME) DO MICROBIONTE, FOTOBIONTE E TALO DO LÍQUEN *TELOSCHISTES FLAVICANS*.

Fração		27°C ^a		23°C ^a		BBM		TM	Fevereiro		Agosto	Fevereiro		Agosto	Agosto	
		MI	18.5 %	MI	15.8 %	F BBM	16.5 %	F TM	LI	19.4 %	LI	19.1 %	LSA	17.6 %	LSA	19.5 %
AGME	Rendimento %	Rt														
C _{14:0}	(ácido mirístico)	6.7	1,6	-	-	-	-	2,2	3,0	-	-	2,9	-	0,8	-	2,2
C _{15:0}	(ácido pentadecanóico)	7.4	Tr.	-	-	-	-	1,0	1,1	1,0	Tr.	0,7	0,7	0,4	0,3	0,3
C _{15:1}	(ácido pentadecenóico)	7.9	0.4	-	-	-	-	0,3	-	-	-	-	1,9	-	-	-
C _{16:0}	(ácido palmítico)	8.3	35,0	21,9	36,4	56,1	56,4	36,4	56,4	36,4	56,1	2,8	46,7	36,2		
C _{16:1}	(ácido palmitoléico)	8.5	-	-	-	-	-	-	-	0,7	-	4,0	1,1	-		
C _{17:0}	(ácido heptadecanóico)	9.2	-	-	-	-	-	1,2	1,2	-	1,1	3,9	2,0	-		
C _{18:0}	(ácido stearico)	10.3	24,5	19,2	63,1	27,8	27,6	2,4	29,3	4,0	42,6	11,3				
C _{18:1}	(ácido oléico)	10.7	13,7	48,6	tr.	-	-	-	-	12,5	-	12,5	-	19,0		
C _{18:2}	(ácido linoléico)	11.3	10,1	4,0	-	-	-	-	39,3	-	44,0	2,7	27,7			
C _{18:2}	(ácido linoléico)	12.4	2,8	-	-	-	-	-	7,3	-	6,9	0,8	-	-		
C _{20:0}	(ácido araquidônico)	12.8	2,4	1,8	tr.	3,4	3,0	-	3,8	-	1,0	3,0				
C _{22:0}	(ácido behênico)	15.4	3,4	1,6	tr.	3,4	3,4	-	3,3	-	0,3	-				
C _{24:0}	(ácido lignocénico)	18.5	4,3	2,9	-	tr.	Tr.	-	Tr.	-	1,3	-				
C _{24:1}	(ácido tetracosenóico)	19.5	1,2	-	-	4,1	3,9	-	3,1	-	-	-				

MI: MICROBIONTE; F BBM: FOTOBIONTE EM MEIO BBM; F TM: FOTOBIONTE EM MEIO TM; LI: LÍQUEN INTACTO; LSA: LÍQUEN SEM APOTÉCIO; A: APOTÉCIO. Rt: TEMPO DE RETENÇÃO.

^a temperatura de cultivo do microbionte de *T. flavicans*.

FIGURA 3.1: VARIAÇÃO DA COMPOSIÇÃO DE ÁCIDOS GRAXOS DE *Teloschistes flavicans*, SEU MICOBIONTE, *Xanthoria parietina* *Physcia stellaris* E *Physcia dubia*. O EIXO DAS ABSCISSAS INDICA A TEMPERATURA AMBIENTAL NA REGIÃO DE COLETA. * DEMBITSKY ET AL., 1994 A. ** DEMBITSKY ET AL., 1994 B.



3.4.2. Composição de ácidos graxos em micobiontes submetidos a diferentes condições de crescimento.

No intuito de observar se condições nutricionais mais próximas àquelas observadas *in vivo*, bem como a variação de nutrientes na resposta fisiológica do micobionte, onze meios de culturas diferentes foram testados. Os meios testados incluem os meios S4%, MY, BBM, TM, LBM (mais quatro meios com alguma variação em relação à fonte de Carbono e Nitrogênio presentes neste meio) e mais dois meios de cultura, novos (NOVO 1 e NOVO2). O objetivo foi observar o comportamento da composição do conteúdo de ácidos graxos e monossacarídeos em condições nutricionais diferentes.

O primeiro ponto a ser observado é com relação ao crescimento obtido em cada meio. No intuito de se obter uma comparação possível entre os diferentes meios, o meio LBM foi admitido como crescimento padrão e considerado o seu crescimento como médio. A partir do crescimento obtido no meio LBM foi organizada uma escala de crescimento que apresenta os seguintes valores: nulo (0), muito baixo (*), baixo (**), médio (***), alto (****) e muito alto (*****).

O resultado de crescimento está apresentado na tabela 3.2, e os meios de culturas que apresentam o melhor desenvolvimento (muito alto) são os meios SS4 e MY. Estes apresentam extrato de levedura em sua composição. Em seguida o TM (peptona e glucose) apresenta também um alto desenvolvimento das colônias.

Os resultados mostram que, conforme esperado, as culturas crescidas em meios que apresentam fontes de nitrogênio como extrato de levedura e peptona, consideradas altamente energéticas, apresentam um melhor desenvolvimento. Em contrapartida, micobiontes crescidos em meios contendo aminoácidos como: fenilalanina, asparagina ou mesmo uma mistura de aminoácidos como presente no hidrolisado de caseína, o desenvolvimento é menor.

Com relação à fonte de carbono, o extrato de malte, seguido pela glucose são as fontes com os quais o micobionte apresenta um melhor desenvolvimento. Sacarose, comumente utilizado em culturas de fungos, e o manitol, em uma tentativa de mimetizar o poliol fornecido pela alga em seu estado natural, apresentaram um baixo crescimento.

TABELA 3.2: COMPOSIÇÃO E CRESCIMENTO EM DIFERENTES MEIOS DE CULTURA DO MICOBIONTE DE *T. flavicans*.

Meio	C ₀	%	N ₀	%	Outros	Cresc.	Cresc.
LBM	Glucose	4	Asparagina	0,2	a	***	***
LBM 1	Glucose	4	Cas + Phe	0,2 + 0,2	a	***	***
LBM 2	Glucose	4	Cas + Phe	0,1 + 0,1	a	***	***
LBM 3	Manitol	4	Asparagina	0,2	a	**	**
LBM 4	Sacarose	4	Asparagina	0,2	a	**	**
BBM	- - - -	0	- - - -	0	b	-	-
TM	Glucose	1,5	Peptona	0,5	b	****	****
MY	E. Malte	2	E. Levedura	0,2	-	*****	*****
SS4	Glucose	2	Pep + E. Lev	0,5 + 0,5	-	*****	*****
Novo 1	Glucose	3	Asparagina	0,2	-	*	*
Novo 2	Glucose	1	Cas + Phe	0,2 + 0,2	-	*	*

a) MgSO₄; KH₂PO₄; FeSO₄; ZnSO₄; MnSO₄; tiamina, biotina.

b) MgSO₄; KH₂PO₄; K₂HPO₄; FeSO₄; ZnSO₄; MnCl₂; H₃BO₃; CaCl₂; NaCl; MoO₃; CuSO₄; Co(NO₃)₃; EDTA; KOH; NaNO₃.

-) Nulo

**) Baixo

****) Alto

*) Muito Baixo

***) Médio (padrão)

*****) Muito Alto

Quanto à fonte de carbono, o extrato de malte, seguido pela glucose são as fontes com os quais o micobionte apresenta um melhor desenvolvimento. Sacarose, comumente utilizado em culturas de fungos, e o manitol, em uma tentativa de mimetizar o poliol fornecido pela alga em seu estado natural, apresentaram um baixo crescimento.

Não houve diferenças no crescimento do micobionte com relação ao fotoperíodo. Além disso, a relação entre o crescimento no meio LBM e os demais se manteve constante com 3 ou seis meses de cultivo.

Com relação ao rendimento do extrato clorofórmio-metanol nos diferentes meios de cultura não foi observado nenhum padrão de distribuição que possa representar uma maior produção de lipídeos em alguma das condições ou meios observados. Poderíamos esperar uma maior concentração de ácidos graxos em um maior tempo de cultivo, o que poderia representar a produção de lipídeos para reserva. Entretanto este padrão foi observado apenas em duas situações, como nos meios MY e LBM, o que torna difícil confirmar se este processo está realmente ocorrendo. Aparentemente o fotoperíodo também não influencia no rendimento do extrato clorofórmio-metanol (Tabela 3.3).

Oobserva-se uma diminuição no teor de ácidos graxos insaturados de acordo com o tempo de exposição a luz, ou seja, colônias crescidas em 24 horas de luz apresentam, na maioria dos casos, um menor teor de ácido graxos insaturados. Desta maneira podemos

sugerir que colônias desenvolvidas em menos luz apresentam uma tendência a ter uma maior fluidez de membrana (Tabela 3.3).

Um estudo com o líquen *Parmelia tictinta* demonstrou que quando este era submetido ao escuro aumentava o seu teor de ácidos graxos insaturados (Bychek & Bychek, 1996). Os autores deste trabalho sugeriram que este comportamento seria uma provável adaptação fotossintética, uma vez que estes resultados foram também observados para a alga verde *Chlorella* sp (NYUPPIEVA et al., 1980).

Os dados obtidos com culturas de micobionte, ou seja, sem a presença do fotobionte, apresentaram um resultado similar. Observou-se um aumento de instauração em menor incidência luminosa. Desta maneira, outros fatores, e não apenas a fotossíntese gerada pelo fotobionte, estariam envolvidos neste comportamento. Além disso, o tecido proveniente da alga é, em geral, menor que de 10% do total do talo em um líquen da família Parmeliaceae. Desta maneira, mudanças geradas no fotobionte apresentariam um pequeno efeito nos ácidos graxos totais do líquen.

Outro fator que parece exercer influência no teor de saturação dos ácidos graxos é a idade do cultivo. Observou-se que colônias com seis meses de cultivo apresentam, em geral, um maior teor de ácidos graxos insaturados. Este comportamento está presente tanto para colônias com fotoperíodo de 12 ou 24 horas de luz (tabela 3.4).

Segundo MOLINA et al., (2003), quando o micobionte é cultivado em meio com alta concentração de glucose, a produção de ácido graxo faz-se necessária para que haja uma reciclagem do NAD(P). Seguindo o mesmo raciocínio, um aumento de insaturações promovido nos ácidos graxos levaria a uma reciclagem de NAD (complexo emzimático: *NADH-citocromo b5 redutase, citocromo b5 e desaturase*, BERG et al., 2002). Desta maneira pode-se sugerir que o aumento de insaturações presentes em seis meses de cultura se faz necessário para que o micobionte continue a utilizar a glicose disponível no meio. Tendo esta enzima, além da ácido graxo sintase, um importante papel na reciclagem de NAD(P).

TABELA 3.3: CONCENTRAÇÃO DE ÁCIDOS GRAXOS DO MICOBIONTE DE *T. flavicans* EM DIFERENTES CONDIÇÕES DE CULTIVO

		Ácido Graxo													
Meios	Condição	%	C _{14:0}	C _{15:0}	C _{16:0}	C _{16:1}	C _{17:0}	C _{17:1}	C _{18:0}	C _{18:1}	C _{18:2}	C _{18:3}	C _{20:0}	C _{22:0}	C _{24:0}
BBM	1	15,1	-	-	34,7	-	-	-	32,6	24,2	-	3,7	1,0	1,8	1,8
	2	16,8	0,5	-	21,6	-	0,6	-	31,3	35,0	1,8	-	2,7	4,2	2,5
	3	14,5	-	-	33,8	-	-	-	41,5	21,4	2,1	-	0,7	0,5	-
	4	19,7	1,9	-	28,9	-	0,5	-	30,8	25,2	5,3	-	3,9	2,0	2,2
TM	1	16,0	-	-	24,5	-	0,4	-	36,0	17,6	4,6	7,9	2,7	3,3	3,0
	2	16,3	-	-	28,2	-	-	-	35,5	21,3	-	-	9,7	3,4	1,9
	3	12,6	0,5	-	21,0	-	0,4	-	52,0	17,3	1,2	-	2,2	2,9	2,5
	4	31,2	2,4	0,3	30,6	-	0,8	-	53,8	-	1,3	-	3,5	6,8	-
MY	1	19,3	-	-	20,8	-	0,6	-	33,0	29,2	6,3	-	1,9	3,8	4,5
	2	26,9	0,3	0,2	21,1	-	0,5	-	22,2	53,7	0,5	-	1,5	-	-
	3	18,2	0,7	0,3	27,3	-	1,6	-	29,2	29,2	1,8	-	3,2	3,7	3,0
	4	24,5	-	-	26,3	-	0,3	-	25,7	38,9	26,1	-	1,2	1,9	1,8
S4	1	23,6	-	-	26,5	-	-	-	28,6	31,7	5,9	-	1,3	3,2	2,8
	2	26,2	-	0,2	22,9	-	0,4	-	19,6	45,8	3,7	-	1,4	2,4	3,6
	3	20,5	-	-	31,5	-	-	-	30,6	29,6	1,0	-	1,8	2,4	3,1
	4	18,2	-	-	20,2	-	0,3	-	32,1	36,8	4,6	-	1,5	2,1	2,4
LBM	1	13,4	-	-	32,5	-	-	-	22,6	35,1	4,9	-	1,2	1,7	2,0
	2	19,5	0,2	0,2	21,4	-	0,2	-	12,3	55,4	8,5	-	0,5	0,6	0,7
	3	10,7	1,1	0,3	30,2	-	0,7	-	29,6	24,2	4,2	-	2,3	3,8	3,6
	4	15,6	-	-	21,9	-	-	-	19,2	48,6	4,0	-	1,8	1,6	2,9
LBM1	1	18,4	-	-	30,9	-	-	-	23,2	37,5	5,2	-	1,1	1,1	1,0
	2	30,1	0,3	0,2	22,1	-	0,2	-	22,6	43,7	4,2	0,2	1,8	2,0	2,6
	3	16,2	-	-	34,4	-	-	-	47,7	13,4	-	-	1,9	2,6	-
	4	9,8	0,4	0,1	24,7	-	0,3	0,03	23,3	32,5	9,8	-	2,0	2,2	4,1
LBM2	1	28,2	-	-	52,4	-	-	-	21,2	21,5	3,2	-	-	1,2	0,5
	2	38,9	-	-	21,1	-	0,7	-	23,1	49,6	5,5	-	-	-	-
	3	17,8	0,8	0,2	20,2	-	-	0,2	43,8	29,0	3,3	-	0,5	1,0	1,0
	4	12,6	-	-	33,8	-	-	-	19,6	41,5	2,3	-	0,9	0,9	1,0
LBM3	1	10,9	0,4	-	24,8	-	0,2	-	13,9	47,4	-	9,0	1,0	1,5	1,8
	2	16,5	-	-	34,7	-	-	-	29,7	32,3	-	-	-	1,8	1,5
	3	10,2	-	-	27,3	-	0,09	-	19,4	46,0	3,1	-	1,6	1,1	1,2
	4	19,3	-	-	40,1	-	-	-	24,0	28,1	3,8	-	1,6	1,4	1,0
LBM4	1	32,8	0,4	-	23,3	-	-	-	13,1	49,0	9,5	-	-	1,9	2,8
	2	24,1	-	-	32,5	-	-	-	27,7	33,8	0,6	0,8	1,2	1,5	1,9
	3	13,6	-	-	39,0	-	-	-	40,6	11,3	2,4	5,2	1,5	-	-
	4	20,8	-	-	24,7	-	-	-	23,9	51,4	-	-	-	-	-
NOVO 1	1	16,7	-	-	34,3	2,3	1,0	-	35,4	25,7	-	-	1,3	-	-
	2	30,1	0,5	-	42,0	-	-	-	33,0	10,5	-	-	10,0	1,6	1,7
	3	29,1	-	-	33,1	-	0,5	-	36,6	18,4	2,8	4,2	1,1	1,6	1,7
	4	20,9	-	-	28,2	-	-	-	24,1	47,7	-	-	-	-	-
NOVO 2	1	26,1	-	-	35,8	-	-	-	43,2	18,4	-	-	-	2,6	-
	2	28,6	1,1	-	40,0	-	0,7	-	37,8	9,0	1,2	-	1,7	-	6,3

CONDIÇÕES DE CRESCIMENTO: 1) 3 MESES DE CULTIVO E 12 HORAS DE LUZ; 2) 6 MESES DE CULTIVO E 12 HORAS DE LUZ; 3) 3 MESES DE CULTIVO E 24 HORAS DE LUZ; 4) 6 MESES DE CULTIVO E 24 HORAS DE LUZ

TABELA 3.4: RELAÇÃO DE SATURAÇÃO DE ÁCIDOS GRAXOS

Meios	Condição	AG sat (%)	AG insat (%)	Meios	Condição	AG sat (%)	AG Insat (%)
BBM	12 h	71,9	27,9	BBM	12 h	63,4	36,8
	3 meses				6 meses		
	24 h	76,5	23,5		24 h	70,2	30,5
TM	3 meses			TM	6 meses		
	12 h	69,9	30,1		12 h	78,7	21,3
	24 h	81,5	18,5		24 h	98,2	1,3
MY	3 meses			MY	6 meses		
	12 h	64,6	35,5		12 h	45,8	54,2
	24 h	69	31		24 h	57,2	65
S4	3 meses			S4	6 meses		
	12 h	62,4	37,6		12 h	50,5	49,5
	24 h	69,4	30,6		24 h	58,6	41,4
LBM	3 meses			LBM	6 meses		
	12 h	60	40		12 h	36,1	63,9
	24 h	71,6	28,4		24 h	47,4	52,6
LBM1	3 meses			LBM1	6 meses		
	12 h	57,3	42,7		12 h	51,8	48,1
	24 h	86,6	13,4		24 h	57,1	42,33
LBM2	3 meses			LBM2	6 meses		
	12 h	75,3	24,7		12 h	44,9	55,1
	24 h	67,5	32,5		24 h	*	*
LBM3	3 meses			LBM3	6 meses		
	12 h	56,2	43,8		12 h	43,6	56,4
	24 h	67,7	32,3		24 h	50,69	49,1
LBM4	3 meses			LBM4	6 meses		
	12 h	68,1	31,9		12 h	41,5	58,5
	24 h	64,8	35,2		24 h	*	*
N 1	3 meses			N 1	6 meses		
	12 h	81,1	18,9		12 h	48,6	51,4
	24 h	72	28		24 h	88,8	10,5
N 2	3 meses			N 2	6 meses		
	12 h	74,6	25,4		12 h	52,3	47,7
	24 h	81,6	18,4		24 h	87,6	10,2

Molina et al. (2003) afirma ainda que a biossíntese de metabólicos secundários estaria intimamente envolvida com o metabolismo de ácidos graxos. No intuito de verificar como essa relação seria observada para o micobionte de *T. flavicans*, amostras de todos os tratamentos foram enviadas para a Prof. Dra. Elfie Stocker-Wörgötter, da Universidade de Salzburg na Áustria. Espera-se em breve que os resultados desta colaboração permitam uma análise de maneira mais profunda dos resultados obtidos para ácidos graxos.

3.5. Conclusões

A partir dos resultados obtidos para o capítulo 3 podemos concluir que:

- A composição de ácidos graxos presente no líquen *Teloschistes flavicans* não corresponde a soma dos ácidos graxos de seus simbiontes isolados em cultivo.
- O líquen *T. flavicans* apresenta uma maior concentração de ácidos graxos insaturados no verão que no inverno.
- Diferenças nas condições de cultivo, como temperatura e luminosidade alteram o teor de insaturação presente nos ácidos graxos do micobionte de *T. flavicans* em cultivo.

Capítulo 4: Polissacarídeos dos simbioses de *T. flavicans*

4.1. Introdução

4.1.1. Polissacarídeos de líquens

O estudo de polissacarídeos de líquens teve início em 1815 quando BERZELIUS utilizou o *Cetraria islandica* para seus experimentos, extraindo uma glucana insolúvel em água, atualmente chamada liquenana. Porém, foi somente no século passado, principalmente na segunda metade, que a maior parte das pesquisas foi efetuada.

Os polissacarídeos mais comuns dos líquens são os heteropolissacarídeos contendo manose e glucanas. A maioria das glucanas apresenta uma estrutura linear com a presença de ligações glicosídicas na sua configuração α ou β . Devido às suas concentrações relativamente altas, presume-se que estes polissacarídeos sejam de origem micobionte (GORIN et al., 1993). Outros polissacarídeos encontrados em líquen são as xilanas, entretanto o fato de serem encontradas em baixa quantidades, sugere que a sua presença seja devida ao constituinte fotobionte (CORRADI DA SILVA, 1992; GORIN et al., 1993; CORDEIRO, 2000).

As glucanas de líquens são divididas conforme o tipo de ligação e sua proporção molar dentro da molécula. Os principais homopolissacarídeos contendo glucose observados em líquens são as liquenanas, isoliquenanas, pustulanas, nigeranas e laminaranas. A tabela 4.1 mostra os tipos de glucanas em líquens. Uma das características principais do espectro de RMN ^{13}C é a possibilidade de observar os tipos de ligações, a relação molar destas, como se pode observar na figura 4.1.

Revisões recentes sobre polissacarídeos de líquen podem ser encontradas na literatura descrevendo com detalhes as diferenças entre as estruturas e a frequência em que são encontrados (GORIN et al., 1993; SASSAKI et al., 2002; IACOMINI et al., 2005), os métodos de purificação (PAULSEN et al., 2002) e atividades biológicas para os mesmos (OLAFSDOTTIR & INGOLFSDOTTIR, 2001).

TABELA 4.1 : TIPOS DE LIGAÇÃO GLICOSÍDICA PRESENTE EM GLUCANAS DE LIQUENS

Nome da estrutura	Tipo de ligação Deslocamentos em ppm (RMN de ^{13}C)		Relação Molar	Referência
Liquenana	β -(1 \rightarrow 3) (105,3:88,2)	β -(1 \rightarrow 4) (104,1:80,1), (104,5:80,2)	1:2	BARON <i>et al.</i> , 1991
Isoliquenana	α -(1 \rightarrow 3) (100,9:82,1), (100,6:81,9)	α -(1 \rightarrow 4) (101,6:79,3)	2:1	GORIN <i>et al.</i> , 1988
Pustulana	β -(1 \rightarrow 6) (103,3:67,2)		1	SASSAKI <i>et al.</i> 2002
Nigerana	α -(1 \rightarrow 3) (99,5:82,8)	α -(1 \rightarrow 4) (100,0:79,0)	1:1	STUELP <i>et al.</i> 1999
Laminarana	β -(1 \rightarrow 3) (102, 8:86,0)		1	CARBONERO <i>et al.</i> 2001
Pululana	α -(1 \rightarrow 4) (100,5:79,1)	α -(1 \rightarrow 6) (98,1:60,7)	1:1	REIS <i>et al.</i> 2002
Glucanas Ramificadas	β -(1 \rightarrow 3) (103,2:86,1)	β -(1 \rightarrow 6) (103,2:68,6)	2:1	IACOMINI <i>et al.</i> 1987

OS ASSINALAMENTOS ENTRE PARÊNTESES CORRESPONDEM AO CARBONO 1 E CARBONO DA LIGAÇÃO RESPECTIVAMENTE.

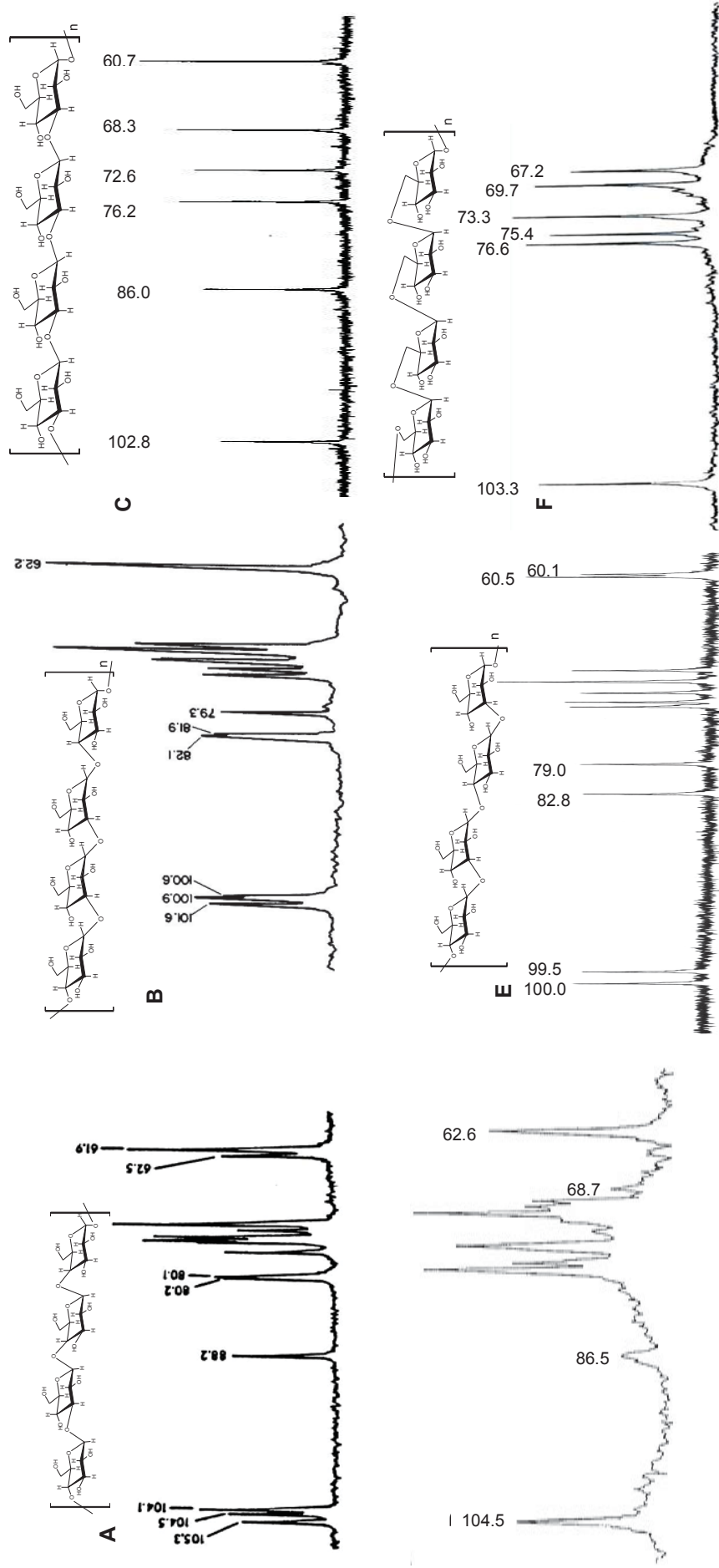


FIGURA 4.1: ESPECTROS DE ^{13}C -RMN (DESLOCAMENTOS QUÍMICOS EM δ , PPM) DE ALGUMAS GLUCANAS DE LIQUENS. **A:** LIQUENANA (*Newpogon aurantiaco-ater*, BARON *et al.*, 1991); **B:** ISOLIQUENANA (*Cetraria islandica*, GORIN *et al.*, 1988); **C:** LAMINARANA (*Cladonia boryi*, CARBONERO *et al.*, 2001); **D:** GLUCANARANIFICADA (*Dictionema glabratum*, IACOMINI, *et al.*, 1987); **E:** NIGERANA (*Cladonia crispatula*, WORANOVICZ-BARREIRA *et al.*, 1999A); OS ESPECTROS DE ^{13}C -RMN DA PUSTULANA (**F**) AND PULLULANA (**G**) FORAM OBTIDOS DOS FUGOS *Guignardia citricarpa* (SASSAKI *et al.*, 2001B) E *Tremella mesentrica* (JENNING & SMITH, 1973) RESPECTIVAMENTE. EXTRAÍDO DE SASSAKI *et al.*, 2002.

4.1.2. Polissacarídeos de *Teloschistes flavicans*

No ascolíquen fruticoso *T. flavicans* Norman foi verificada a presença de uma α -D-glucana do tipo pululana. O espectro de RMN de ^{13}C da pululana de *T. flavicans* (Figura 4.2) apresenta apenas dois sinais na região anomérica, em δ 100,5 e δ 98,1 característicos das ligações α (1 \rightarrow 4) e α (1 \rightarrow 6). A relação de 1:1 das ligações determinada através de RMN de ^1H (Reis et al., 2002) caracteriza esta molécula como uma estrutura nunca antes descrita na literatura. Pululanas de fungos anteriormente descritas, obtidas como exopolissacarídeos, apresentam uma relação molar de 2:1 das ligações α -(1 \rightarrow 4) e α -(1 \rightarrow 6) (GORIN, 1981).

Além da pululana, outra glucana foi caracterizada para o líquen *T. flavicans*. Uma glucana ramificada com ligações do tipo β -(1 \rightarrow 3),(1 \rightarrow 6) na proporção molar de 2:1 (Figura 4.3) (REIS et al., 2002). Esta molécula é similar àquelas encontradas para o basidiolíquen *Dictyonema glabratum* (Iacomini et al., 1987) e o líquen gelatinoso *Collema leptosporum* (PRADO et al., 1999).

FIGURA 4.2: ESPECTRO DE RMN ^{13}C DA PULULANA DE *Teloschistes flavicans*. DESLOCAMENTOS QUÍMICOS EXPRESSOS EM (δ) PPM. SOLVENTE DMSO_{D_6} . EXTRAÍDO DE REIS, 2001.

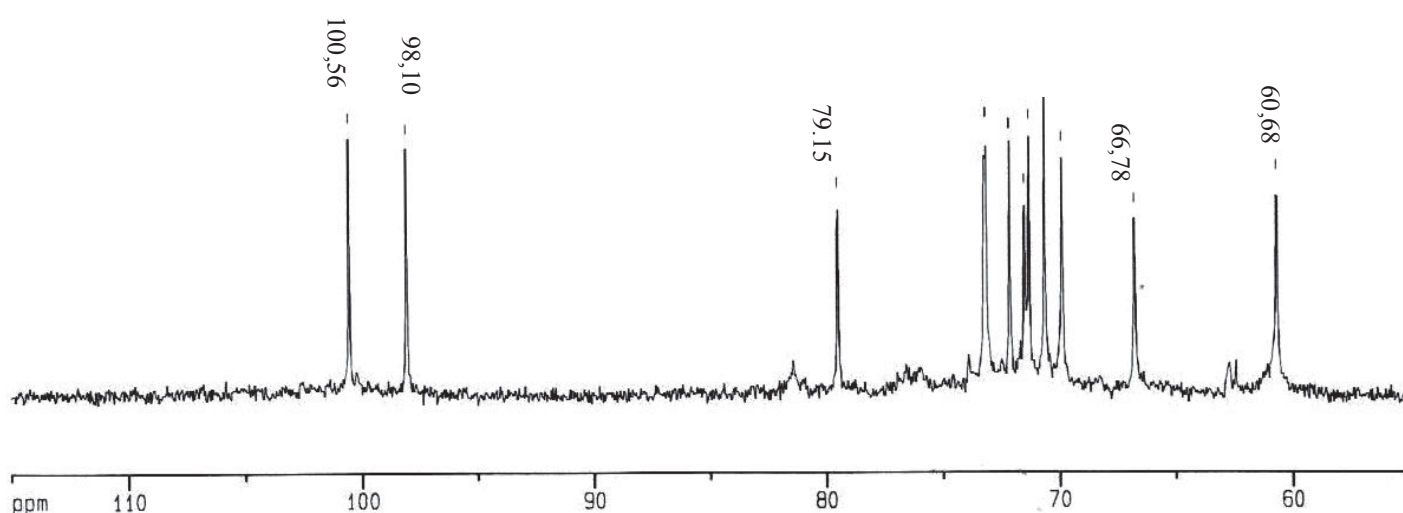
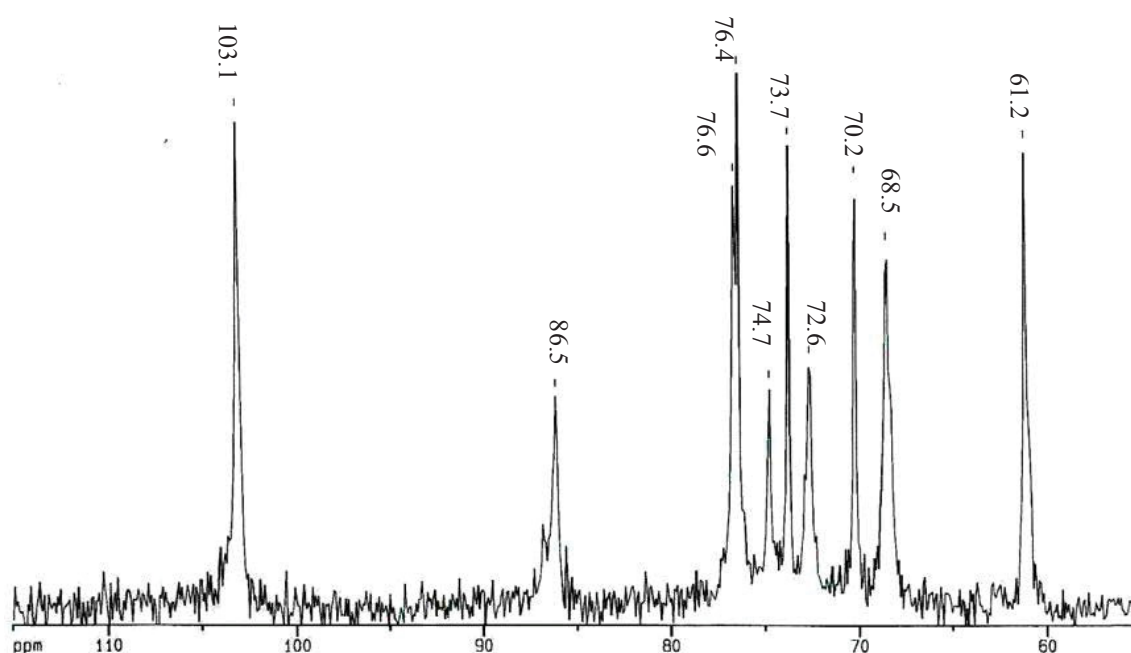


FIGURA 4.3: ESPECTRO DE RMN ^{13}C DA β -D-GLUCANA FRAÇÃO. DESLOCAMENTOS QUÍMICOS EXPRESSOS EM (δ) PPM. SOLVENTE DMSO_{D_6} , TEMP. 70 °C. EXTRAÍDO DE REIS, 2001.



4.1.3. Polissacarídeos de Simbiontes Liquênicos.

Alguns autores acreditam que a chave para o processo de reconhecimento da simbiose líquênica possa estar relacionada com os polissacarídeos presentes na parede celular de seus componentes. A especificidade destes polissacarídeos e o seu reconhecimento por proteínas específicas (como as lectinas) poderia ser o primeiro passo para o estabelecimento da simbiose (AHMADJIAN & JACOBS, 1981; KÖNING & PEVELING, 1984; CORDEIRO et al., 2005).

Embora alguns autores atentem para a importância dos polissacarídeos na relação simbiótica, muito pouco se conhece sobre a sua estrutura e a relação que os diferentes polissacarídeos apresentam no mosaico final do líquen. Alguns autores argumentam que pelas dificuldades técnicas para separar frações puras de micobionte a partir do talo inteiro,

e agravadas pela dificuldade de se obter biomassa em cultivo, uma análise quantitativa da parede celular dos simbiontes liquênicos parece, até o momento, impossível (HONEGGER & BARTINICKI-GARCIA, 1991).

O primeiro estudo da estrutura química dos polissacarídeos de simbiontes liquênicos foi desenvolvido por TAKAHASHI e colaboradores em 1979. Estes autores compararam os polissacarídeos solúveis em água extraídos dos mico- e fotobiontes de líquens cultivados em laboratório com o objetivo de verificar se os polissacarídeos extraídos pelo líquen eram produzidos por algum componente específico da simbiose, ou por ambos. Os resultados, de composição monossacarídica, rotação ótica específica, espectroscopia de infravermelho e solubilidade, mostraram que os polissacarídeos solúveis isolados dos líquens *Cladonia belidiflora*, *C. graciliformis*, *C. rangiferina*, *C. calycantha*, *Cladina mitis*, *Parmelia cerperata* e *Ramalina crassa* são muito similares ou idênticos àqueles obtidos para o micobionte. O principal motivo encontrado pelos autores para que isso ocorra é a predominância de tecido originado do micobionte no talo liquenico, que pode chegar a mais de 90% da massa total do líquen (TAKAHASHI et al, 1979).

A presença de quitina foi determinada por GALUN e colaboradores (1976) para os micobiontes dos *Xanthoria parietina*, *Tornabenia intricata* e *Sarcogyne* sp. Os autores observaram sua presença através da marcação de lectinas específicas, além da microradioautografia, a partir do uso do precursor N-acetilglucosamina, marcado com trítio (H^3). Em 1987 a presença de quitina, foi novamente demonstrada. Desta vez citoquímica (SCHLARMANN, 1987) e enzimaticamente (BOISSERE, 1987), neste mesmo trabalho foi observado também a presença de glucana β -(1 \rightarrow 3).

A localização da liquenana [glucana β -(1 \rightarrow 3) (1 \rightarrow 4)] de *Cetraria islandica* foi determinada através de anticorpo monoclonal (HONEGGER & HAISCH, 2001). Neste estudo o polissacarídeo foi observado somente na matriz extracelular e parede celular do micobionte, não sendo observada em nenhuma porção do fotobionte. O papel sugerido pelos autores é que esta liquenana apresente-se como um elemento estrutural da parede fúngica, com um importante papel nas relações hídricas no talo liquênico.

Desde de 2002, com os trabalhos de cultivo de simbiontes liquênicos (capítulo 2), o Laboratório de Química de Carboidratos vêm desenvolvendo pesquisa com os polissacarídeos de fotobiontes e micobiontes isolados de diversos líquens. Cordeiro e

colaboradores (2004a) observaram em cultura aposimbiótica do micobionte de *Ramalina peruviana* a presença de três polissacarídeos: uma β -glucana (1 \rightarrow 3) (laminarana), uma nigerana [α -glucana (1 \rightarrow 3),(1 \rightarrow 4) 1,2:1] e uma galactomanana. Estes polissacarídeos já haviam sido observados previamente no líquen *R. peruviana* (CORDEIRO et al., 2004b). Curiosamente os autores não observaram a presença, no micobionte, da isoliquenana [α -glucana (1 \rightarrow 3),(1 \rightarrow 4) 3:1] encontrada no líquen (CORDEIRO et al., 2004a).

A maioria dos trabalhos envolvendo carboidratos de fotobiontes está relacionada à fixação de CO₂ do meio (GOLDSMITH et al., 1997; PALMQVIST, 2000), e ao movimento de carboidratos de baixa massa molecular e polióis da alga para o fungo.

Estudos utilizando bicarbonato de sódio, marcado com ¹⁴C, mostraram que diferentes fotobiontes transferem diferentes tipos de moléculas para o micobionte. Quando a cianobactéria *Nostoc* está presente na associação a molécula de transferência é a glucose, a qual, no micobionte, é transformada em manitol e utilizada no metabolismo do fungo. Em líquens que apresentam como fotobionte as algas verdes dos gêneros *Trebouxia*, *Coccomyxa* e *Myrmecia*, o ribitol produzido pelo fotobionte é transferido ao micobionte e então convertido a arabinitol e manitol. Outros polióis também são utilizados como moléculas de transferência como o sorbitol, em associações com o fotobionte *Hyalococcus* e eritritol no caso de *Trentepohlia* (RICHARDSON ET AL., 1967; NASH III, 1996).

Como citado anteriormente (capítulo 1), experimentos envolvendo a resíntese de líquens mostraram uma especificidade do micobionte de *Cladonia rangiferina* pelos fotobiontes do gênero *Trebouxia* (AHMADJIAN & JACOBS, 1981). Outros autores tentando investigar a natureza desta especificidade analisando a composição da parede celular de algumas espécies de *Trebouxia* (*Asterochloris sensu* RAMBOLD et al., 1998) e *Pseudotrebouxia* (*Trebouxia sensu* Rambold et al., 1998) (KÖNIG & PEVELING, 1984). Utilizando métodos cromatográficos, citoquímicos e microscopia eletrônica estes autores observaram uma diferença com relação à composição das paredes celulares de *Trebouxia* e *Pseudotrebouxia*, conforme mostrado na figura 4.4. Em *Trebouxia* a camada interna (S1) consiste principalmente de polissacarídeos celulósicos. Apenas em *T. erici* e *T. glomerata* foram detectadas pequenas quantidades de manose nesta camada. Acredita-se ainda que pequenas quantidades de proteínas estejam presentes nesta camada. A camada S2 é constituída por polissacarídeos não celulósicos, tendo como constituintes presentes

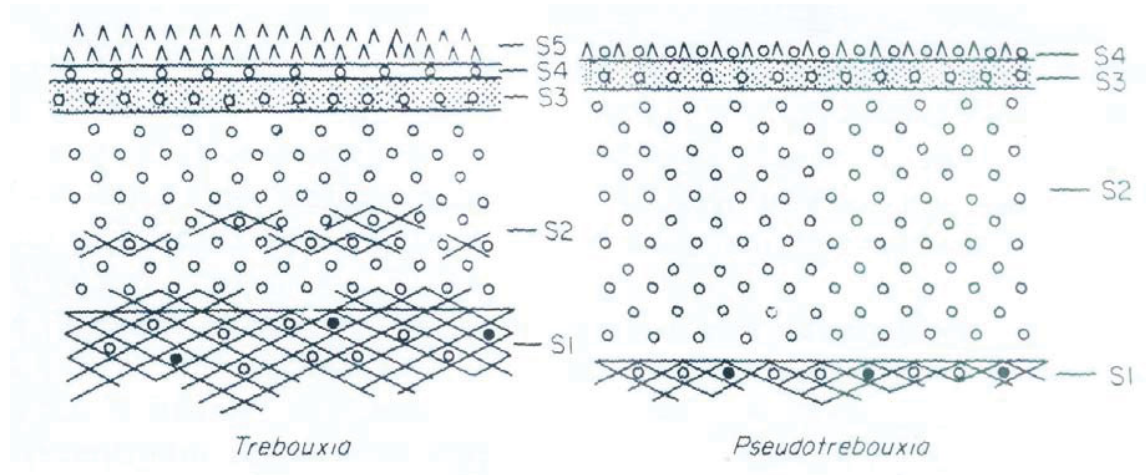
ramnose, xilose, galactose, glucose e manose, variando a proporção de cada unidade de acordo com a espécie. Nesta camada podem ser encontrados ainda polissacarídeos celulósicos. A camada seguinte, S3, apresenta a esporopolenina juntamente com polissacarídeos não celulósicos. A esporopolenina é um polímero de carotenóides, comumente encontrado em algas, e acredita-se desempenhar um papel de resistência na célula contra desidratação ou contra ataques físicos promovidos pelos haustórios dos micobiontes. A última camada (S4 em *Pseudotreboxia* e S5 em *Treboxia*) apresentam os polissacarídeos específicos, os quais poderiam ser responsáveis pelo reconhecimento do fotobionte por parte do micobionte.

Estudos com lectinas demonstraram que especificidade de ligação varia de acordo com a espécie envolvida. As que apresentaram maior capacidade de ligação foram: RCA 60 (isolada de *Ricinus communis*, apresenta afinidade por α e β galactose) para as espécies de *Treboxia* e ConA (isolada de *Canavalia ensiformes*, apresenta afinidade de ligação por α -manose e α -glucose) para as espécies de *Pseudotreboxia*.

Os fotobiontes de *Ramalina gracilis* (*Treboxia*) e *Cladina confusa* (*Asterochloris*), foram isolados e cultivados no Laboratório de Química de Carboidratos da UFPR. Após o cultivo seus polissacarídeos foram isolados e estão em processo de caracterização (CORDEIRO, 2004b). Para o fotobionte de *R. gracilis* foram encontrados pelo menos seis moléculas diferentes, sendo três solúveis em água. Até o momento uma β -galactofuranana, com ligações do tipo (1 \rightarrow 5), e amido foram caracterizados (CORDEIRO et al., 2005).

Para a *Asterochloris* isolada de *Cladina confusa* foram isoladas: amilose, uma xilana β -(1 \rightarrow 4) linear, um heteropolímero insolúvel e uma galactofuranana com ligações do tipo (1 \rightarrow 5) e (1 \rightarrow 6) diferente daquela isolada para o fotobionte de *R. gracilis* (CORDEIRO, 2004b).

FIGURA 4.4: DESENHO ESQUEMÁTICO DE VÁRIAS CAMADAS E SEUS CONSTITUINTES DE PAREDE CELULAR DE *Trebouxia* E *Pseudotrebouxia*.



- ^) POLISSACARÍDEOS ESPÉCIE-ESPECÍFICOS;
- o) POLISSACARÍDEOS DE GLC, GAL, MAN, RHA, XYL;
- X) CELULOSE
-) PROTEÍNA
- ▨) ESPOROPOLLENINA

EXTRAÍDO DE: KÖNING & PEVELING, 1984

4.2. Objetivos

4.2.1. Objetivo geral

O objetivo deste trabalho é extrair, purificar e caracterizar os polissacarídeos presentes nos simbiontes isolados de *T. flavicans*.

4.2.2. Objetivos específicos

- Extrair, purificar e caracterizar as glucanas presentes nos micobionte isolado de *T. flavicans*, e comparar com as moléculas presentes no líquen intacto.
- Extrair, purificar e caracterizar os polissacarídeos presentes no fotobionte isolado de *T. flavicans*, e comparar com moléculas presentes no líquen intacto e isoladas de outros fotobiontes.

4.3. Material e métodos

4.3.1. Material de estudo

Os simbiontes (micobionte e fotobionte) de *T. flavicans* foram isolados e cultivados conforme descrito no Capítulo 2. As culturas resultantes foram liofilizadas e submetidas a extração, purificação e caracterização estrutural de alguns de seus polissacarídeos.

4.3.2. Isolamento dos polissacarídeos do micobionte de T. flavicans

O micobionte foi submetido a extrações sequenciais com acetona e com hidróxido de potássio em três concentrações (KOH 2, 10 e 30 %) crescentes conforme descrito abaixo.

4.3.2.1. Extração Acetona.

O material inicial foi deslipidificado, utilizando-se como solvente a acetona (100% - 400 ml) (WORANOVICZ-BARREIRA et al., 1999) sob refluxo em banho-maria a 60° C, durante duas horas. O processo foi repetido duas vezes.

Após cada extração, o extrato foi filtrado ainda quente e evaporado até secar em temperatura ambiente, com intuito de se calcular o rendimento.

O material residual foi seco à temperatura ambiente para ser posteriormente submetido ao próximo processo extrativo.

4.3.2.2. Extração dos polissacarídeos

O resíduo da extração com acetona foi tratado com solução aquosa de hidróxido de potássio (KOH) na presença de boroidreto de sódio (NaBH₄). Foram realizados três processos extrativos, utilizando-se concentrações crescentes de alcali.

A primeira extração foi realizada com KOH 2%, por duas horas, sob refluxo, a 100 °C (WORANOVICZ-BARREIRA, 1999c). O extrato foi filtrado ainda quente e o resíduo submetido a um novo processo extrativo seguindo as mesmas condições. O extrato obtido foi denominado TFM-A.

O resíduo resultante foi tratado novamente com uma solução aquosa de hidróxido de potássio 10% a 100 °C, o extrato foi filtrado ainda quente e o resíduo submetido a um novo processo extrativo seguindo as mesmas condições. O extrato obtido foi denominado TFM-B.

O resíduo resultante foi tratado novamente com uma solução aquosa de hidróxido de potássio, desta vez a 30% a 100 °C foi filtrado ainda quente e o extrato obtido foi denominado TFM-C.

Posteriormente às extrações, as frações obtidas foram neutralizadas com ácido acético, concentradas e dialisadas em sistema aberto por 48 horas.

4.3.2.3. Purificação dos polissacarídeos

As frações TFM-A e TFM-C foram submetidas a uma série de processos de purificação, para separação e purificação de seus polissacarídeos.

4.3.2.4. Separação dos polissacarídeos por congelamento e degelo.

As frações obtidas da extração alcalina a 2% (TFM-A) e 30% (TFM-C) foram submetidas ao processo de purificação de congelamento e degelo descrito por GORIN e IACOMINI (1984). As amostras resultantes das diálises foram concentradas, congeladas e em seguida submetidas ao degelo em temperatura ambiente. Os precipitados insolúveis em água fria foram separados dos demais componentes solúveis por centrifugação (9000 rpm, 20 min.).

Este processo foi repetido diversas vezes até que o sobrenadante não formasse mais precipitado. Por outro lado o precipitado foi submetido novamente ao processo de congelamento e degelo por mais três vezes com finalidade de retirar possíveis compostos solúveis contaminantes da amostra. Os materiais foram precipitados com excesso de etanol (3:1 v/v).

O resultado deste processo foi a obtenção das frações sobrenadante de gelo e degelo (TFM-A1) e precipitado de gelo e degelo (TFM-A2) para a fração TFM-A. Para a fração TFM-C foram obtidas como resultantes do processo de purificação as frações sobrenadante de gelo e degelo (TFM-C1) e precipitado de gelo e degelo (TFM-C2), a qual foi caracterizada estruturalmente.

A Fração TFM-A2 foi concentrada, e então submetida a um novo processo de purificação através da metodologia de congelamento e degelo, conforme a descrição acima. Deste processo duas foram as frações resultantes: a fração precipitado de gelo e degelo (TFM-A3) e sobrenadante de gelo e degelo (TFM-A4), a qual foi também caracterizada estruturalmente.

O processo de purificação dos polissacarídeos do micobionte de *T. flavicans* é apresentado na Figura 4.5 (página 108) .

4.3.3. Isolamento dos polissacarídeos do fotobionte de *T. flavicans*

O fotobionte de *T. flavicans* foi submetido a extrações sequenciais com clorofórmio/metanol (2:1), metanol-água (4:1), água e concentrações crescentes de hidróxido de potássio conforme descrito a seguir.

4.3.3.1. Isolamento dos polissacarídeos

O líquen foi submetido a extrações sequenciais com clorofórmio – metanol (2:1), metanol - água (4:1), para extração de seus componentes lipídicos, carboidratos de baixa massa molecular e glicoconjugados. Em seguida foi submetido á extrações com água, KOH 2% e 10% para extração dos polissacarídeos.

4.3.3.2. Deslipidificação

O material inicial foi deslipidificado, utilizando-se uma mistura de solventes clorofórmio - metanol (2:1 v/v - 400 ml) (WORANOVICZ-BARREIRA, 1999c) sob refluxo em banho-maria a 80° C, durante 2 horas. O processo foi repetido duas vezes.

Após cada extração, o extrato foi filtrado, ainda quente, e evaporado até securo em temperatura ambiente, com intuito de se calcular o rendimento.

O material residual foi seco à temperatura ambiente para ser posteriormente submetido ao próximo processo extrativo.

4.3.3.3. Extração de carboidratos de baixa massa molecular e alditóis

O material residual da deslipidificação foi submetido a duas extrações consecutivas sob refluxo com uma solução de metanol - água (4:1 - 400ml), na temperatura de 80 °C

durante duas horas. O extrato etanólico ainda quente foi filtrado e evaporado até secar em temperatura ambiente para cálculo do rendimento.

O material residual foi seco a temperatura ambiente para ser posteriormente submetido ao próximo processo extrativo.

4.3.3.4 .Extração dos polissacarídeos

O resíduo da extração etanólica foi submetido a três processos extrativos, utilizando-se primeiramente água, seguido de concentrações crescentes de hidróxido de potássio (KOH- 2 e 10%). As extrações foram realizadas na presença de boroidreto de sódio (NaBH_4).

A primeira extração foi realizada com água, por 2 horas, sob refluxo, a 100 °C (WORANOVICZ-BARREIRA, 1999C). O extrato foi filtrado ainda quente e o resíduo submetido a um novo processo extrativo seguindo as mesmas condições. O extrato obtido foi denominado TTF-A.

O resíduo resultante foi tratado com uma solução aquosa de hidróxido de potássio a 2 %. O extrato foi filtrado ainda quente e o resíduo submetido a um novo processo extrativo seguindo as mesmas condições. O extrato obtido foi denominado TTF-B.

O resíduo resultante foi tratado novamente com uma solução aquosa de hidróxido de potássio, desta vez a 10 %. O extrato foi filtrado ainda quente e o extrato obtido foi denominado TTF-C.

Posteriormente às extrações, as frações provenientes de extração alcalina foram neutralizadas com ácido acético, concentradas e dializadas em sistema aberto por 48 horas.

4.3.3.4. Purificação dos polissacarídeos

A fração TTF-A foi submetida a uma série de processos de purificação, para separação e purificação de seus polissacarídeos.

4.3.3.5. Separação dos polissacarídeos por congelamento e degelo.

A fração obtida da extração aquosa (TTF-A) foi submetida ao processo de purificação por congelamento e degelo, descrito por GORIN & IACOMINI (1984). A amostra resultante da diálise foi concentrada, congelada e em seguida submetida ao degelo em

temperatura ambiente. O precipitado insolúvel em água fria foi separado dos demais componentes solúveis por centrifugação (9.000 r.p.m., 20 min.).

Este processo foi repetido diversas vezes até que o sobrenadante não formasse mais precipitado. Por outro lado o precipitado foi submetido novamente ao processo de congelamento e degelo por mais três vezes com finalidade de retirar possíveis compostos solúveis contaminantes da amostra. Os materiais foram precipitados com excesso de etanol.

O resultado deste processo foi a obtenção das frações sobrenadante de gelo e degelo (TTF-A1.) e precipitado de gelo e degelo (TTF-A2) para a fração TTF-A.

4.3.3.6. Desproteinização através de precipitação com ácido tricloroacético (TCA)

A fração TTF-A1 foi desproteinada com auxílio de ácido tricloroacético a 5%. À amostra dissolvida em volume conhecido foi adicionado igual volume de uma solução de ácido tricloroacético 10% p/v (obtendo uma solução final de 5%). A solução foi agitada vigorosamente e deixada precipitar *overnight* em geladeira. Os precipitados contendo proteínas foram separados por centrifugação (10.000 r.p.m. por 20min). Sobrenadante (TTF-A3) e precipitado resultante (TTF-A4) foram dialisados em água corrente, congelados e liofilizados.

4.3.3.7. Filtração por membranas

A amostra TTF-A3 foi submetida a um novo processo de purificação através de filtração em membrana com limite de exclusão de 10.000 Da (Acetato de celulose - Milipore). As amostras foram filtradas sob pressão de ar comprimido. Após a filtração as frações filtradas (TTF-A5) e retida (TTF-A6) foram liofilizadas. A fração TTF –A5 apresentou-se pura e foi caracterizada conforme os métodos abaixo.

O processo de purificação dos polissacarídeos do fotobionte de *T. flavicans* é apresentado na Figura 4.12. (página 121)

4.3.4. Análise estrutural dos polissacarídeos em estudo

4.3.4.1. Determinação da composição em monossacarídeos

As amostras de carboidratos a serem estudadas (1 a 5 mg) foram tratadas com solução aquosa de TFA 1 mol/L (~2 ml) durante oito horas a 100 °C (WORANOVICZ-BARREIRA, 1999). O TFA remanescente foi removido por evaporação à secua das soluções hidrolisadas. Os polissacarídeos hidrolisados foram dissolvidos em água e submetidos a redução e acetilação.

As amostras foram reduzidas com NaBH₄ (WOLFROM & THOMPSON, 1963), em temperatura ambiente por 16 horas. Em seguida utilizou-se resina catiônica para eliminação dos íons sódio. Após filtração por algodão as soluções foram concentradas até a secua sob pressão reduzida. O ácido bórico resultante desse tratamento foi eliminado por co-destilação com metanol na forma de borato de trimetila.

Os alditóis obtidos foram acetilados em uma mistura de anidrido acético - piridina (1:1, v/v) a 100 °C por 1 hora. O processo foi interrompido com adição de água ao sistema, sendo este posteriormente levado ao gelo por cinco minutos. Os acetatos de alditóis resultantes foram extraídos com clorofórmio. A piridina residual foi removida por lavagens sucessivas com solução de sulfato de cobre a 2 %, após o que, a fração clorofórmica foi desidratada com auxílio de sulfato de sódio anidro e filtrada por algodão (WOLFROM & THOMPSON, 1963).

4.3.4.2. Metilação dos polissacarídeos

As amostras dos polissacarídeos obtidos (insolúveis em água) foram metiladas segundo o método descrito por CIUCANU & KEREK (1984). Os polissacarídeos foram solubilizados em DMSO com auxílio de temperatura. Após solubilização adicionou-se NaOH seco e pulverizado seguindo de agitação por 20 minutos com subsequente adição de iodeto de metila e mais 20 minutos de agitação. O processo foi repetido quatro vezes em intervalos de 30 minutos. Interrompeu-se a reação pela adição de água destilada gelada, sendo que o material foi imediatamente levado à diálise em água corrente onde permaneceu por três dias.

Uma amostra de cada polissacarídeo metilado foi submetida a metanólise com solução de metanol - ácido clorídrico a 3,5 % (v/v - 2ml), em estufa a 80 °C por duas horas (GORIN & IACOMINI, 1984). Após a adição de carbonato de prata para eliminação do ácido, na forma de cloreto de prata, o material foi extraído com acetona e filtrado por papel de filtro, sendo que este filtrado, após evaporação até secura com pressão reduzida, foi submetido a hidrólise com 2 ml de ácido sulfúrico 2 mol/L durante 8 horas a 100° C.

O excesso de ácido sulfúrico foi eliminado com carbonato de bário e a solução centrifugada. O centrifugado límpido foi tratado com boroidreto de sódio e acetilado pelo método anteriormente descrito com anidrido acético - piridina (1:1 v/v), sendo os alditóis acetatos parcialmente *O*-metilados resultante analisados por cromatografia gasosa acoplada a espectrometria de massa (GC-MS) em colunas capilares revestidas com DB -23 ou DB - 225 como se descreve adiante.

4.3.4.3. Métodos analíticos

Cromatografia líquido-gasosa acoplada à espectrometria de massa (GC-MS)

As análises cromatográficas em fase gasosa acoplada à espectrometria de massa foram realizadas usando-se: cromatógrafo a gás "VARIAN", modelo 3300, acoplado a um espectrômetro de massa da marca FINNIGAN ION-TRAP, modelo 810 R-12, munido com ITS-40 e equipado com coluna capilar de sílica fundida revestida com DB – 225; e cromatógrafo a gás "VARIAN", modelo Saturno 2000, acoplado a um espectrômetro de massa da marca FINNIGAN ION-TRAP. As injeções foram feitas utilizando-se a seguinte programação: Temperatura inicial da coluna de 50°C, após injeção, aumento de temperatura a 40°C/min até 220°C e mantida constante, o gás de arraste foi o Hélio ultrapuro, com fluxo de 2 mL/min.

Esse método foi empregado para quantificação de acetatos de alditóis e acetatos de alditóis parcialmente metilados (JANSSON et al., 1967), identificados pelos seus perfis característicos de fragmentação e pelos seus tempos de retenção, os quais foram comparados com aqueles de padrões co-injetados. As áreas dos picos foram obtidas por integração automática.

Para melhor separação dos alditóis parcialmente metilados, em coluna DB-23, as injeções foram feitas utilizando a seguinte programação: Temperatura inicial da coluna 50 °C, após injeção, aumento da temperatura de 40°C/min até 180 °C e mantida constante. O gás de arraste foi hélio ultrapuro, com fluxo de 2ml/ min.

Espectroscopia de ressonância magnética nuclear (RMN)

Os espectros de ressonância nuclear magnética de carbono-13 foram obtidos pelo uso de espectrômetro BRUKER DRX -400, com frequência de 100 MHz. As amostras foram solubilizadas em D₂O (água deuterada) e DMSO -d₆ (Dimetilsulfóxido deuterado). Utilizou-se como sinal de referência em ppm: a acetona (30,20 ppm), em amostras solúveis em D₂O e o DMSO - d₆ em amostras solúveis no mesmo. Os deslocamentos químicos foram expressos em δ (p.p.m.).

4.3.4.4. Métodos gerais

Os métodos complementares utilizados nos experimentos foram:

- os solventes e reagentes utilizados apresentavam características P.A., exceto para o etanol utilizado para precipitação dos polissacarídeos em solução, o qual apresentava pureza comercial;
- a precipitação dos polissacarídeos em excesso de etanol corresponde aproximadamente a uma parte de solução de polissacarídeos para três partes de etanol;
- as pesagens de precisão foram feitas em balança analítica METTLER, modelo AB 204. Outras pesagens foram feitas em balança ACCULAB, modelo V-1200;
- as concentrações de soluções foram realizadas em: rotaevaporador FISATOM, modelo 802, sob pressão reduzida, cuja temperatura permanecia próxima dos 50 °C; foi também utilizado o SPIN VAC, marca SAVANT, modelo SC 210 A, com rotor Rh 200-12;
- as centrifugações foram realizadas em centrífuga BECKMAN, modelo GS- 15 (9.000 r.p.m.), HITACHI HIMAC CR 21E, e na microcentrífuga eppendorf 5417c (15000 r.p.m.);
- as liofilizações das soluções foram feitas em aparelho EDWARDS;
- as medidas de pH foram determinadas em potenciômetro MICRONAL, modelo B222, em temperatura ambiente, ou com fitas reativas MERCK;

4.4. Resultados e Discussão

4.4.1. Isolamento dos polissacarídeos do micobionte de *T. flavicans*

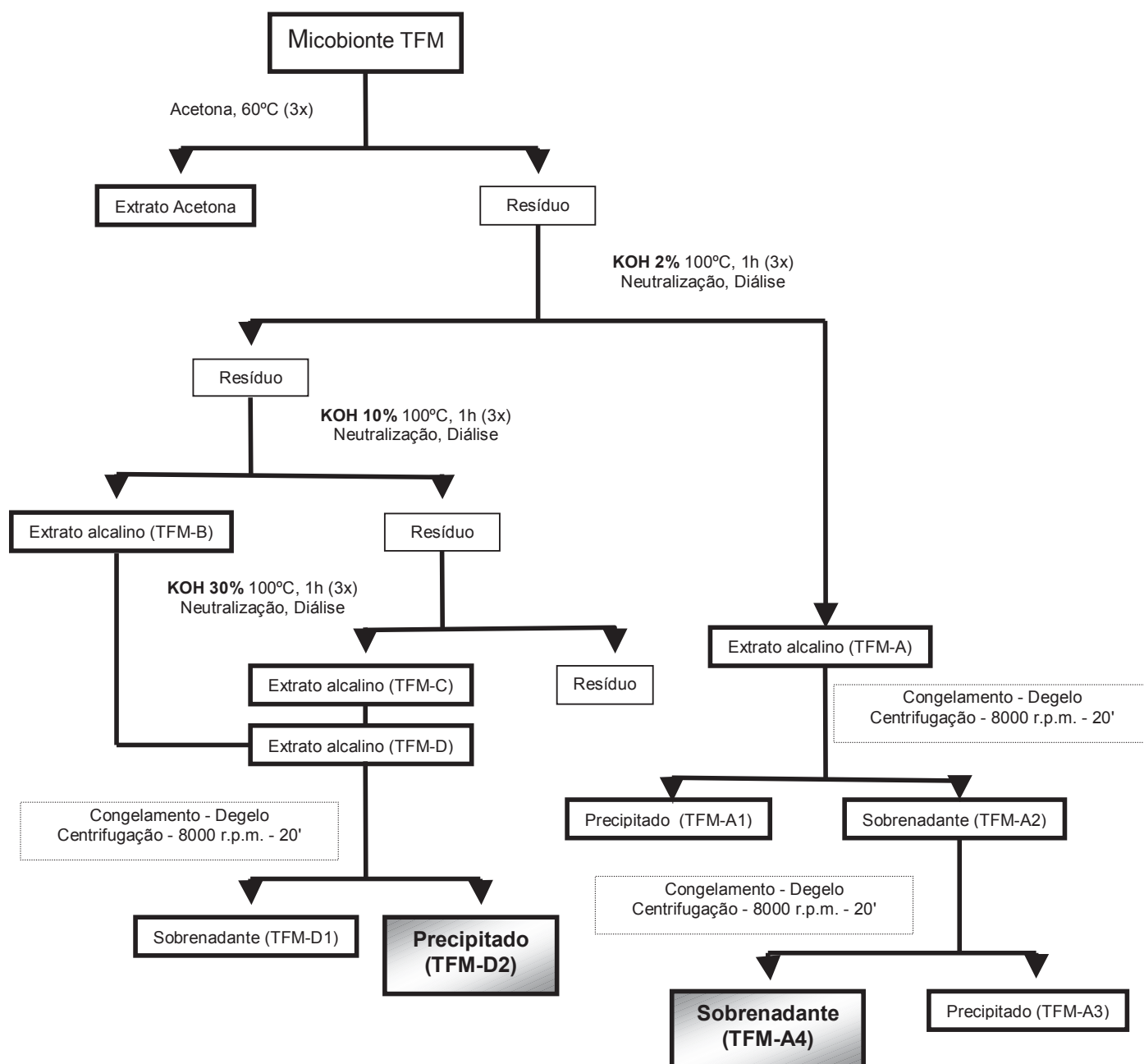
Após o cultivo por quatro meses as colônias do micobionte de *T. flavicans* foram retiradas da placa e limpas para a remoção do ágar presente nas mesmas, sendo então liofilizados. O micobionte liofilizado (8,71 g) foi pulverizado e submetido a diversos processos de extração (Figura 4.5). Primeiramente foi feita uma extração com acetona, um solvente que pode extrair os lipídeos, glicolipídeos e outros compostos apolares. O extrato apresentou um rendimento de 1,7% (0,141 g) como mostra a tabela 3. Essa fração, denominada de extrato acetona, foi reservado para avaliações posteriores.

O material residual obtido após extração com acetona foi submetido a extração alcalina a quente, de acordo com o esquema observado na Figura 4.5, conforme descrito em materiais e métodos. As frações obtidas com os sucessivos processos de fracionamento foram analisadas quanto à sua composição em monossacarídeos e por espectroscopia de RMN de ^{13}C , para verificação de sua pureza.

O extrato alcalino, obtido por extração com KOH 2%, foi denominado de TFM-A, neutralizado com ácido acético e em dialisado para remoção do sal formado, sendo em seguida liofilizado e forneceu um rendimento de 13 % (1,153g). O resíduo desta extração alcalina foi submetido a duas novas extrações, desta vez com soluções de hidróxido de sódio a 10% e 30%, originando as frações TFM-B e TFM-C. Essas amostras, da mesma maneira que a anterior foram neutralizadas, dializadas e liofilizadas. Os rendimentos, apresentados na tabela 4.2, foram de 4,7% (0,411g) e 5,7% (0,503g) respectivamente. A fração TFM-B foi reservada para análises posteriores.

A composição de monossacarídeos das frações TFM-A, TFM-B e TFM-C apresentou uma composição crescente de glucose quando comparada aos outros monossacarídeos, como pode ser observado na tabela 4.3.

FIGURA 4.5: FLUXOGRAMA DE EXTRAÇÃO E PURIFICAÇÃO DOS POLISSACARÍDEOS DO MICOBIONTE DE *T. flavicans*



A fração TFM-A foi submetida a processos sucessivos de congelamento e degelo para separação dos polissacarídeos solúveis dos insolúveis em água fria, fornecendo então duas frações: sobrenadante do congelamento e degelo (TFM-A1) e precipitado do congelamento e degelo (TFM-A2).

As frações TFM-A1 e TFM-A2 foram então liofilizadas e forneceram rendimentos de 8% (0,692g) e 0,7% (0,059g) respectivamente (Tabela 4.2). Após o término do procedimento de congelamento e degelo, as frações foram investigadas quanto às suas composições em monossacarídeos. A fração TFM-A1 apresentou como componentes monossacarídicos majoritários, a glucose, manose galactose e ramnose. Os quais foram analisados na forma de acetatos de alditóis. A fração TFM-A2, insolúvel em água fria apresentou os mesmos monossacarídeos principais, entretanto o teor de glucose se apresentou maior nesta fração.

Como o principal objetivo do trabalho foi investigar a presença de glucanas, no intuito de compará-las com aquelas obtidas por REIS e colaboradores (2002) para o líquen intacto, a fração TFM-A1 foi reservada para estudos posteriores, sendo os próximos processos de purificação focados na fração TFM-A2.

A fração TFM-A2 foi dissolvida novamente, desta vez em mínimo volume, e submetido a novo fracionamento por congelamento e degelo. Novamente foi observada a presença de um precipitado e um sobrenadante, indicando que o processo anterior não tinha sido adequado para o fracionamento completo da fração. As frações resultantes foram denominadas TFM-A3 (precipitado de gelo e degelo) e TFM-A4 (sobrenadante de gelo e degelo). A fração insolúvel (TFM-A3) apresentou um rendimento de 0,15% (0,013g) e mostrou se heterogênea quanto a sua composição de monossacarídeos. A fração TFM-A4 apresentou um rendimento de 0,4% (0,035g) e é constituída basicamente de glucose (94%). A figura 4.6 acompanha o processo de purificação da fração TFM-A4 através de RMN de ^{13}C .

Por se apresentar constituída basicamente de glucose a fração TFM-A4 foi submetida a processos de caracterização estrutural e será discutida posteriormente.

TABELA 4.2: RENDIMENTO DAS FRAÇÕES TFM (MICOBIONTE DE *T. flavicans*)

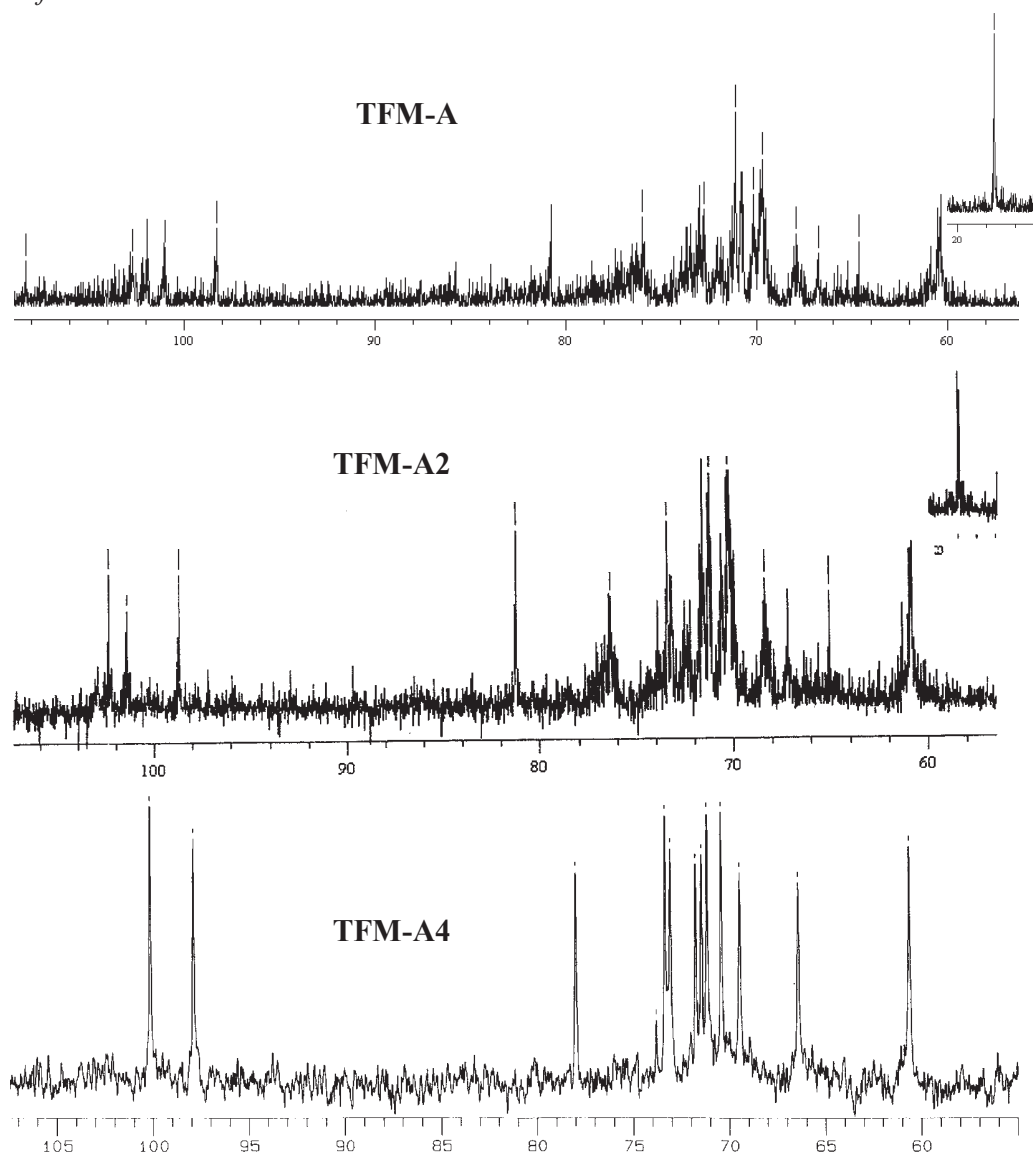
Fração	Massa (em g)	Rendimento (em %)
TFM (micélio)	8,71	
Extrato acetona	0,141	1,7
TFM - A	1,153	13,0
TFM – A1	0,692	8,0
TFM – A2	0,059	0,7
TFM – A3	0,013	0,15
TFM – A4	0,035	0,4
TFM –B	0,411	4,7
TFM – C	0,503	5,7
TFM – D	0,900	10,3
TFM – D1	0,341	3,9
TFM – D2	0,470	5,3

TABELA 4.3: COMPOSIÇÃO MONOSSACARÍDICA DAS FRAÇÕES OBTIDAS COM O FRACIONAMENTO DAS EXTRAÇÕES AQUOSA E ALCALINA DO MICOBIONTE DE *T. flavicans*

COMPOSIÇÃO MONOSSACARÍDICA						
	Rha	Ara	Xil	Man	Gal	Glc
TFM-A	9	-	-	43	8	40
TFM-A1	14	5	-	50	12	19
TFM-A2	7	-	-	22	42	29
TFM-A3	5	-	-	18	34	43
TFM-A4	tr	-	-	2	3	95
TFM-B	2	3	2	11	9	73
TFM-C	2	2	-	8	10	78
TFM-D1	2	2	-	9	13	74
TFM-D2	-	-	-	2	4	94

Por GC-MS, como acetatos de alditóis, coluna DB-225, temp. 50°C →220°C a 40°C/min.

FIGURA 4.6: ESPECTRO DE RMN DE ^{13}C DAS FRAÇÕES TFM-A, TFM-A2 E TFM-A4 OBTIDAS POR PROCESSO DE PURIFICAÇÃO DOS POLISSACARÍDEOS DO MICROBIONTE DE *T. flavicans*.



Por apresentarem uma composição monossacarídica similar, tendo glucose como principal componente, as frações TFM-B e TFM-C foram agrupadas no intuito de se trabalhar com maior quantidade de material. Sendo assim, a partir de agora trataremos esta fração pelo nome TFM-D.

A fração D (10,3% - 0,90g) foi submetida a um processo de congelamento e degelo. Este procedimento gerou duas frações, a primeira solúvel e outra insolúvel em água fria, as quais denominadas respectivamente TFM-D1 e TFM-D2. A fração precipitado de congelamento e degelo (TFM-D2) apresentou-se constituída basicamente de glucose (95%). A fração TFM-D1, embora apresentasse como constituinte principal a glucose, apresentou também outros monossacarídeos constituintes, como manose e galactose. A fração TFM-D1 foi reservada para estudos posteriores.

A alta concentração de glucose presente em TFM-D2 sugere que esta fração seja uma glucana. Sendo assim, esta fração foi caracterizada quanto à sua estrutura.

4.4.2. Caracterização estrutural dos polissacarídeos do micobionte de *T. flavicans*

A glucana presente na fração TFM-A4 foi submetida a uma análise por espectroscopia de RMN ^{13}C . O espectro do polissacarídeo apresentou 12 sinais, sendo que na região dos carbonos anoméricos foi determinada a presença dos sinais em δ 100,16 e δ 97,9 (Figura 4.7.). Este perfil do espectro caracteriza a presença de um polissacarídeo apresentando dois tipos de ligação, sendo constituído exclusivamente de glucose.

O sinal em δ 100,16 é característico de unidades de glucose com anomericidade alfa e o sinal em δ 78,01 caracteriza a presença de ligação α -(1 \rightarrow 4) (Gorin, 1988). O espectro de RMN ^{13}C DEPT inverteu os sinais em δ 60,64 ppm, representativo de $-\text{CH}_2$ livre e em δ 66,44 ppm, característico de $-\text{CH}_2$ O-ligado, indicando a presença de ligação do tipo α -(1 \rightarrow 6) (Figura 4.8). Sugerindo a presença de uma glucana com ligações do tipo α -(1 \rightarrow 4) (1 \rightarrow 6).

Através da análise de RMN ^1H desta fração foi possível realizar a integração das áreas correspondentes ao H-1, fornecendo a proporção das ligações (1 \rightarrow 4) e (1 \rightarrow 6), uma vez que não há sobreposição de sinais nesta região. O valor encontrado para a glucana foi de 1,00 e 1,14 (Figura 4.8), sugerindo uma relação 1:1 de ligações (1 \rightarrow 4) e (1 \rightarrow 6).

Além da proporção molar das ligações, o espectro de ^1H das amostras permitiu a confirmação da anomericidade destas ligações. A boa resolução do espectro permitiu a observação do duplete formado pelos prótons, cuja distância calculada para ambas as amostras foi de 2,71 Hz, caracterizando-as como ligações α (alfa).

A análise de metilação do polissacarídeo apresentou os derivados 2,3,4-tri-*O*-metil-glucitol (48 %) e 2,3,6-tri-*O*-metil-glucitol (47,5 %). Estes dados confirmam a presença de ligações (1 \rightarrow 4) e (1 \rightarrow 6) na proporção molar de 1:1 (Tabela 4.4).

A partir dos resultados obtidos, sugere-se, que a α -D-glucana, presente na fração TFM-A4, do micobionte isolado do líquen *Teloschistes flavicans* apresenta uma estrutura com cadeia linear alternando ligações do tipo (1 \rightarrow 6) e (1 \rightarrow 4), sendo assim caracterizada como uma pululana.

TABELA 4.4.: ANÁLISE POR METILAÇÃO DA GLUCANA ISOLADA NA FRAÇÃO TFMA-4

O-metilalditol	Proporção relativa (%)*	Tipo de ligação
2,3,4-Me ₃ -Glc	48	(1 \rightarrow 6)
2,3,6-Me ₃ -Glc	47,5	(1 \rightarrow 4)

*Proporção (%) da área do pico relativa à área total dos picos

FIGURA 4.7: ESPECTRO DE RMN ^{13}C DA FRAÇÃO TFM-A4, APRESENTANDO A α -GLUCANA (1 \rightarrow 4) (1 \rightarrow 6)-LIGADA, DENOMINADA PULULANA. DESLOCAMENTOS QUÍMICOS EM (δ) PPM, SOLVENTE D_2O .

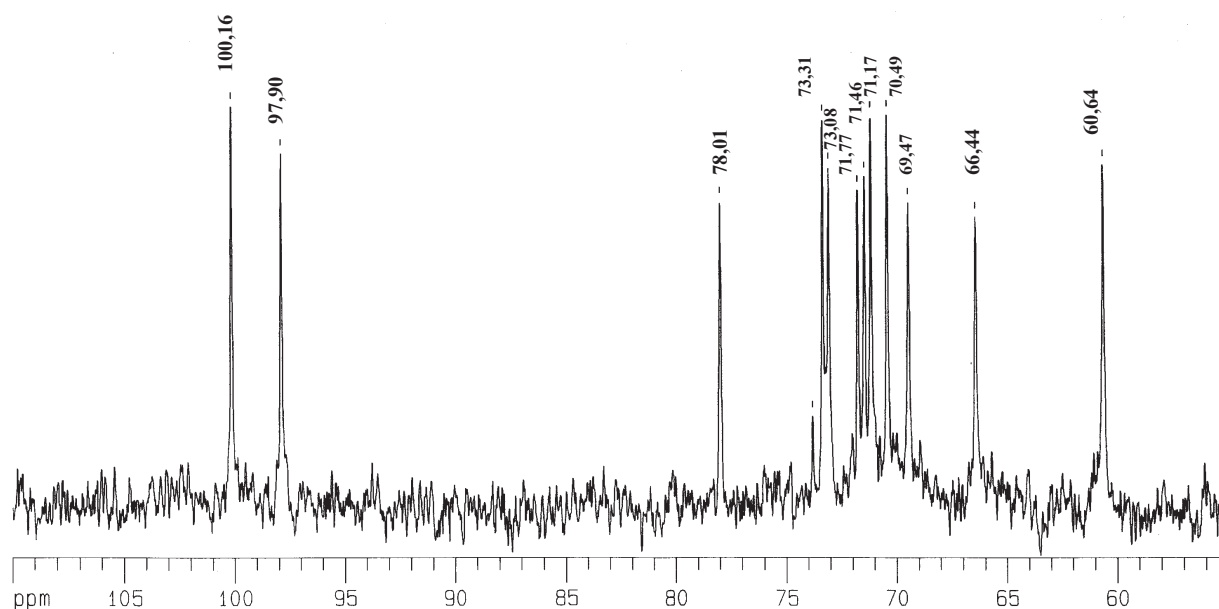


FIGURA 4.8: DETALHE DO ESPECTRO DE RMN ^{13}C – DEPT DA FRAÇÃO TFM-A4, DA α -GLUCANA (1 \rightarrow 4) (1 \rightarrow 6)-LIGADA, DENOMINADA PULULANA. DESLOCAMENTOS QUÍMICOS EM (δ) PPM, SOLVENTE D_2O .

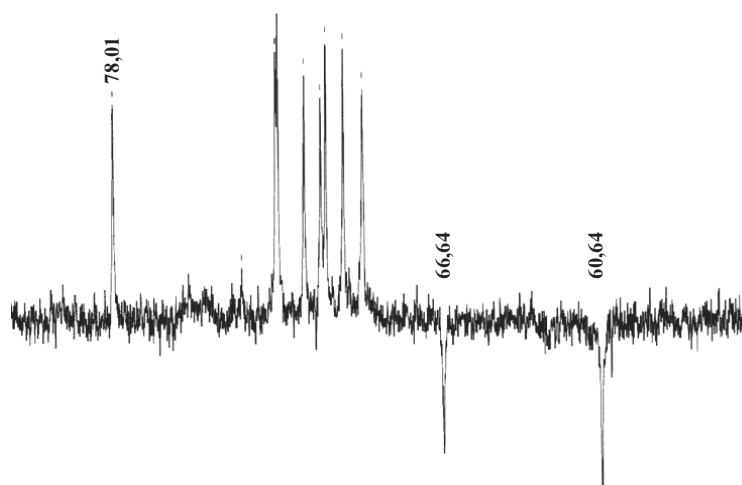
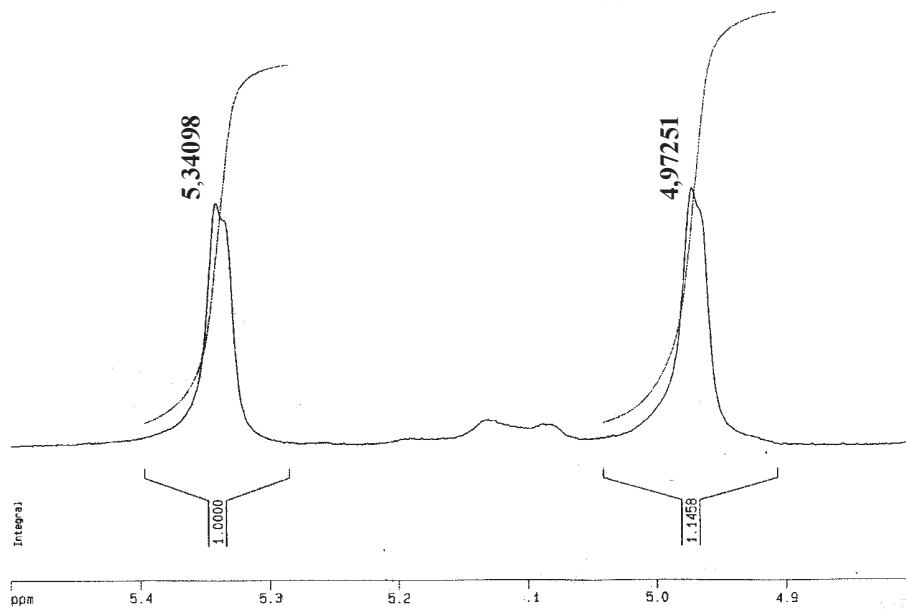


FIGURA 4.9: INTEGRAÇÃO DA REGIÃO DE H-1 DO ESPECTRO DE RMN ^1H DA α -GLUCANA ISOLADA DO MICROBIONTE DO LÍQUEN *Teloschistes flavicans*. SOLVENTE D_2O . OS DESLOCAMENTOS QUÍMICOS FORAM EXPRESSOS EM (δ) PPM.



A fração TFM-D2 apresentou um rendimento de 5,3% (0,470 g) (Tabela 4.2). Apresentou-se constituída de 94 % de glucose (Tabela 4.3) indicando a presença de uma glucana no material que permaneceu insolúvel no precipitado de congelamento e degelo do extrato alcalino (10 e 30%). Glucanas insolúveis são freqüentemente encontradas no precipitado de congelamento e degelo de extratos alcalinos. Estudos de caracterização com glucanas (WORANOVICZ-BARREIRA, 1999; CARBONERO et al., 2001) mostraram para o gênero *Cladonia* a presença de duas glucanas nesta fração, sendo a primeira uma α -D-glucana com ligação (1 \rightarrow 3) (1 \rightarrow 4) na proporção molar de 1:1 (caracterizando uma nigerana), e a segunda uma laminarana, β -D-glucana linear com ligação (1 \rightarrow 3). REIS e colaboradores (2002) relatam ainda a presença de uma β -glucana ramificada para a mesma fração de *Teloschistes flavicans*.

O espectro de RMN ^{13}C , da fração TFM-D2, demonstrou a presença de 10 sinais sugerindo uma sobreposição de sinais, sendo que na região de C-1 observou-se apenas a presença dos sinais anoméricos em δ 103,9 e 102,8 (Figura 4.11).

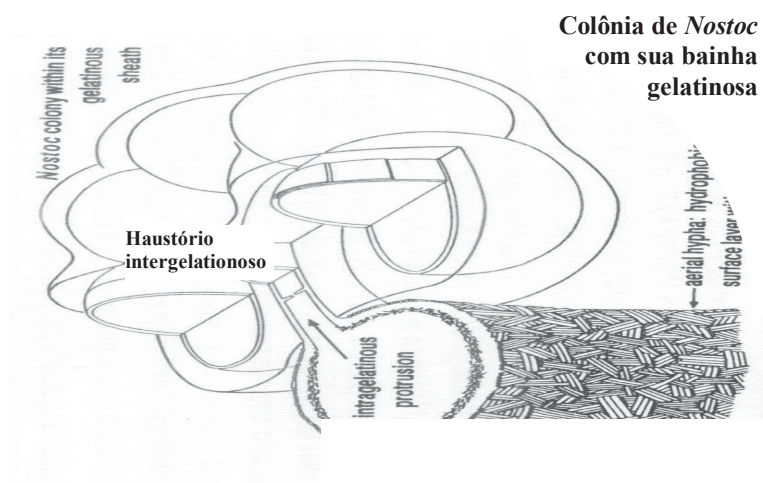
O sinal em δ 102,87 é característico de unidades de glucose com anomeridade beta, e o sinal em δ 86,84 indica unidades de β -D-Glucose ligadas (1 \rightarrow 3). Os sinais correspondentes aos C-2, C-4 e C-5 estão compreendidos na faixa de δ 76,25 a δ 68,33, enquanto que o sinal em 60,82 corresponde ao C-6 livre das unidades monossacarídicas (IACOMINI et. al., 1987; PRADO et. al., 1999).

A análise de metilação do polissacarídeo, como demonstrado na tabela 4.5, apresentou os derivados 2,3,4-tri-*O*-metil-Glc (16,5%) e 2,4,6-tri-*O*-metil-Glc (51,5%), confirmando a presença das ligações (1 \rightarrow 6) e (1 \rightarrow 3), respectivamente. Além destes, foram encontrados os derivados 2,4-di-*O*-metil-Glc (16%) e 2,3,4,6-tetra-*O*-metil-Glc (16%) indicando a presença de ramificação na molécula (15%). Estes resultados demonstram uma relação molar entre as ligações (1 \rightarrow 3) e (1 \rightarrow 6) próxima de 3:1.

Desta maneira, os dados sugerem a presença de uma β -glucana ramificada, com ligações do tipo (1 \rightarrow 3) e (1 \rightarrow 6). Uma glucana similar a esta já havia sido descrita para os líquens *Teloschistes flavicans* (REIS et al., 2002), *Collema leptosporum* (PRADO et al., 1999) e *Dictyonema glabratum* (IACOMINI et al., 1987). A relação existente entre esses líquens que poderia explicar a presença desta molécula não é muito clara: os dois últimos apresentam como fotobiontes cianobactérias, *T. flavicans* apresenta uma alga verde do gênero *Trebouxia* (Capítulos 1 e 2). Porém, *T. flavicans* e *C. leptosporum* são ascolíquens, enquanto *D. glabratum* é um basidiolíquen.

Beta-glucanas são conhecidas por desempenhar um papel estrutural na parede celular de leveduras, por isso alguns autores sugerem que estas moléculas sejam mais do que apenas componentes estruturais. O papel de retenção de água para β -glucanas em líquens foi proposto por HONEGGER e HAISCH (2001). Estes autores analisando o líquen *Cetraria islandica* observaram através do uso de anticorpo monoclonal, que uma β -glucana β -(1 \rightarrow 3) (1 \rightarrow 4) (liquenana), presente no líquen de *Cetraria islandica*, apresentava-se na matriz extracelular e parede celular do micobionte, não tendo sido observada em nenhuma porção do fotobionte.

FIGURA 4.10: DIAGRAMA MOSTRANDO A INTERAÇÃO EXISTENTE O LÍQUEN *Peltigera*, ENTRE O MICOBIONTE E O FOTOBIONTE *Nostoc*. EXTRAÍDO DE HONEGGER, 1991.



Líquens que apresentam cianobactérias como fotobionte, em geral, necessitam de alta umidade para se desenvolver, uma vez que a passagem de nutrientes do fotobionte para o micobionte se dá através de contato célula-célula, mas sim o haustório do micobionte penetram a bainha gelatinosa do fotobionte, a qual necessita estar hidratada (figura 4.10), (HONEGGER, 1991). Desta maneira é possível que a presença desta molécula nestes líquens, embora seja originada do micobionte, possa desempenhar um papel auxiliar na regulação hídrica impedindo o ressecamento da bainha gelatinosa das cianobactérias.

Ainda que o líquen *T. flavicans* não apresente cianobactéria como fotobionte, provavelmente esta molécula desempenhe um papel similar neste organismo. Todavia, mais experimentos são necessários para a determinação da real estrutura da parede celular dos líquens e os papéis desempenhados por seus componentes estruturais.

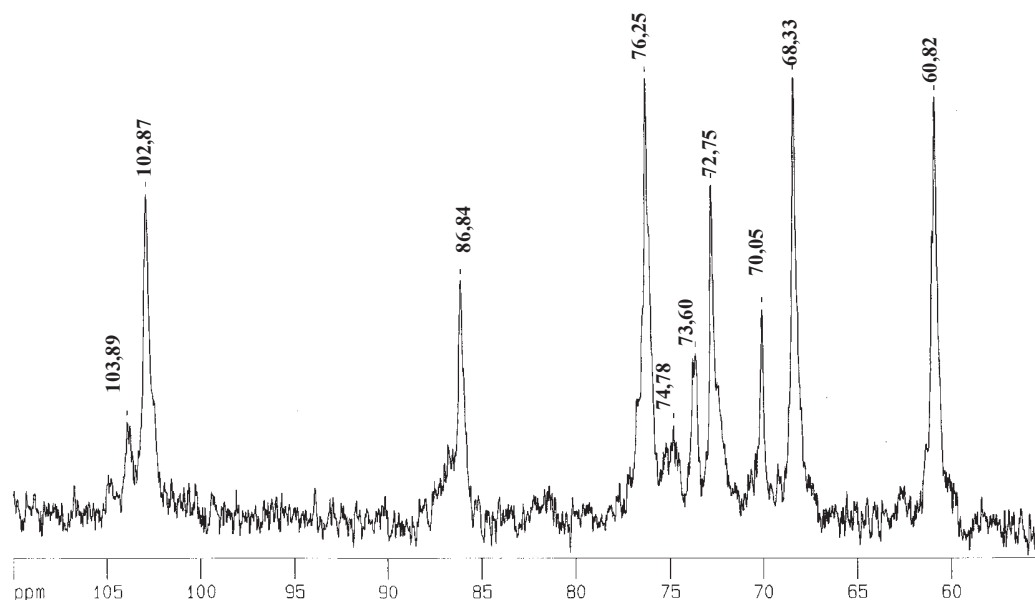
TABELA 4.5: ANÁLISE DE METILAÇÃO DA GLUCANA ISOLADA NA FRAÇÃO TFM-D2

O-metilalditol	Proporção relativa (%)*	Tipo de ligação
2,4-Me ₂ -Glc	16	(1→3) (1→6)
2,3,4-Me ₃ -Glc	16,5	(1→6)
2,4,6-Me ₃ -Glc	51,5	(1→3)
2,3,4,6-Me ₄ -Glc	16	t.n.r.**

*Proporção (%) da área do pico relativa à área total dos picos

**Terminal não redutor

FIGURA 4.11: ESPECTRO DE RMN ¹³C DA FRAÇÃO TFM-D2, APRESENTANDO A β-GLUCANA (1→3) (1→6)-LIGADA. DESLOCAMENTOS QUÍMICOS EM (δ) PPM, SOLVENTE DMSO_{D6}.



As duas glucanas observadas para o micobionte isolado de *Teloschistes flavicans* em cultivo demonstraram-se idênticas àquelas obtidas para o líquen intacto (figuras 4.3 e 4.2) (REIS, 2001; REIS et al., 2002). Estudos desenvolvidos por TAKAHASHI e colaboradores em 1979, utilizando composição monossacarídica, sugeriram que a composição de polissacarídeos isolados do líquen se assemelha a do micobionte isolado. Estes autores não encontraram relação entre os polissacarídeos do líquen com os isolados do fotobionte, e sugeriram que este fato ocorre porque o tecido do micobionte representa mais de 90% da massa total do líquen.

CORDEIRO e colaboradores (2004a) em estudos comparativos dos polissacarídeos do líquen *Ramalina peruviana* e seu micobionte isolado observaram em ambos a presença de três polissacarídeos: uma β -glucana (1 \rightarrow 3) (laminarana), uma nigerana [α -glucana (1 \rightarrow 3)(1 \rightarrow 4) 1,2:1] e uma galatomanana. Estes autores não detectaram a presença, no micobionte, da isoliquenana [α -glucana (1 \rightarrow 3),(1 \rightarrow 4) 3:1] encontrada no líquen (CORDEIRO et al., 2003b; CORDEIRO, 2004b; CORDEIRO et al., 2004a).

A partir da análise de todos estes dados, os resultados obtidos indicam que as glucanas isoladas do líquen *T. flavicans* (REIS et al., 2002), sejam produzidas pelo seu micobionte.

4.4.3. Isolamento e caracterização do polissacarídeo do fotobionte de *T. flavicans*.

O fotobionte isolado do líquen *T. flavicans* foi cultivado em meio líquido, por 30 dias, com agitação e fotoperíodo constante, conforme detalhado no capítulo 2. O cultivo do fotobionte gerou após liofilização, 53 gramas de material.

O fotobionte (53g) foi submetido à extração com clorofórmio-metanol, processo que remove pigmentos e outras substâncias lipossolúveis, como glicolípideos. O extrato apresentou um rendimento de 20,7 % (11,6 g), como mostrado na tabela 4.6. Essa fração, denominada de extrato clorofórmio-metanol, foi reservada para avaliações posteriores, especialmente no que se refere à caracterização estrutural de seus lipídeos e glicolípideos. O material residual foi posteriormente extraído com solução de metanol-água (4:1). Esta extração foi realizada para obtenção de carboidratos de baixa massa molecular. O rendimento desta extração, exibido na tabela 4.6, foi de 8,11% (4,3g). Assim como a fração

clorofórmio-metanol, a fração metanol-água foi reservada para a análise posterior de seus componentes de baixa massa molecular.

O material residual foi submetido a uma extração aquosa de acordo com o esquema apresentado na figura 4.12. O material proveniente da extração aquosa foi dialisado e liofilizado e apresentou um rendimento de 10,5% (5,6 g) e foi denominado TTF-A, que por sua vez foi submetida a processos de purificação para a caracterização de seus polissacarídeos. O resíduo da extração aquosa foi submetido a extrações alcalinas sequenciais com soluções de hidróxido de potássio a 2% e 10%. Os extratos obtidos foram neutralizados com ácido acético, sendo em seguida dializados e liofilizados gerando as frações TTF-B e TTF-C, as quais apresentaram um rendimento de 11,88 % (6,3g) e 5,1 % (2,7g), respectivamente. As frações originadas das extrações alcalinas foram reservadas para serem estudadas posteriormente.

A fração TTF-A apresentou como monossacarídeo predominante a galactose (70,8 %), conforme apresentado na tabela 4.7.. Essa amostra foi submetida a uma sequência de processos de purificação, conforme demonstrado na figura 4.12. Entre os processos de purificação observou-se o congelamento e degelo, precipitação de proteínas com ácido tricloroacético (TCA) e finalmente filtração em membrana.

TABELA 4.6: RENDIMENTO DAS FRAÇÕES TTF (*Trebouxia* DE *T. flavicans*)

Fração	Massa (em g)	Rendimento (em %)
TTF (alga)	53	
CHCl ₃ :MeOH	11,6	20,7
MeOH:H ₂ O	4,3	8,1
TTF-A	5,6	10,5
TTF-A1	2,84	5,3
TTF-A2	1,23	2,3
TTF-A3	0,52	1,0
TTF-A4	1,45	2,7
TTF-A5	0,093	0,2
TTF-B	6,3	11,9
TTF-C	2,7	5,1

FIGURA 4.12: FLUXOGRAMA DE EXTRAÇÃO E PURIFICAÇÃO DOS POLISSACARÍDEOS DO FOTOBIONTE DE *T. flavicans*

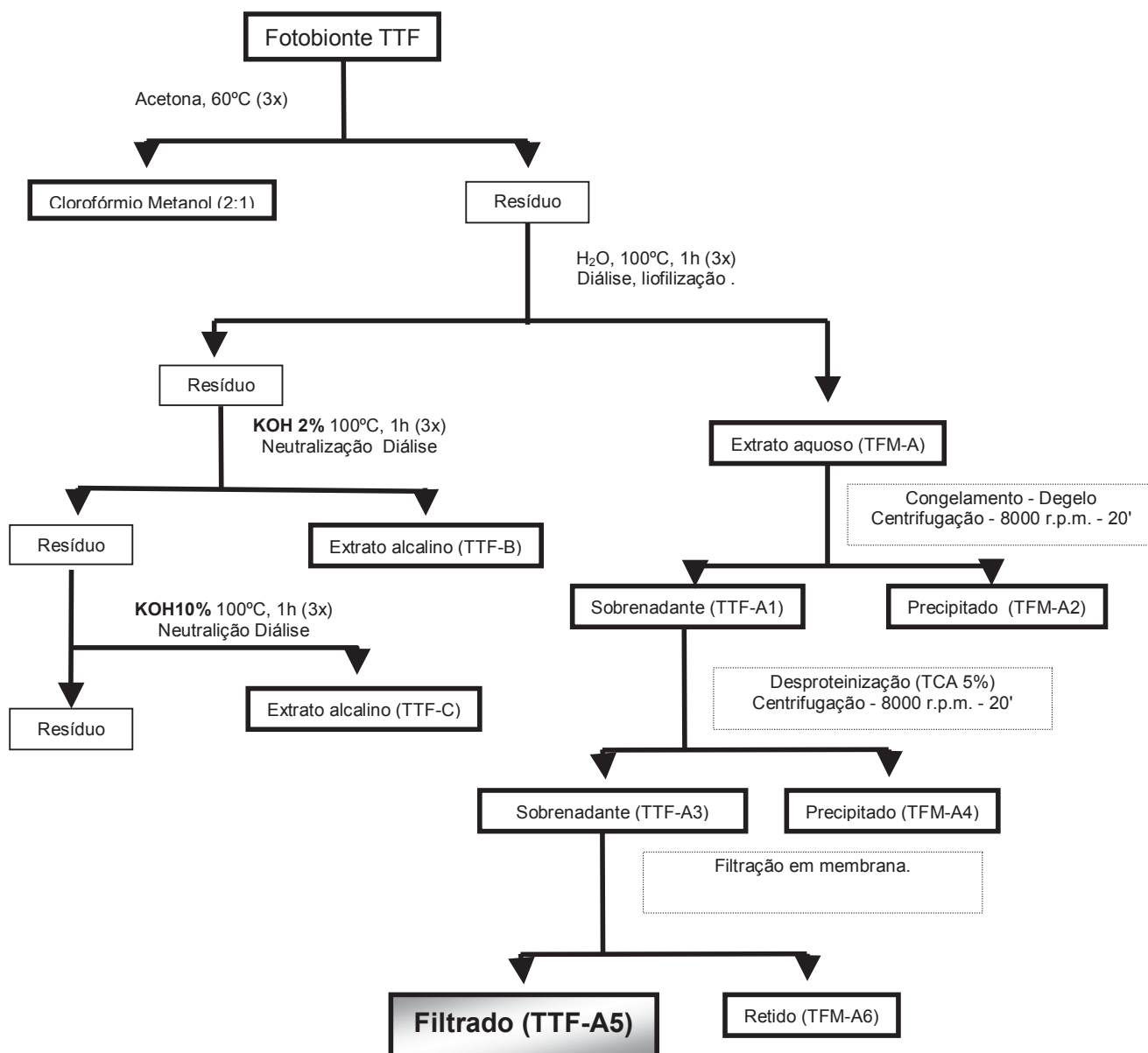


TABELA 4.7: COMPOSIÇÃO MONOSSACARÍDICA DAS FRAÇÕES OBTIDAS DE EXTRAÇÕES E PURIFICAÇÃO DAS FRAÇÕES DO MICOBIONTE DE *T. flavicans*

	COMPOSIÇÃO MONOSSACARÍDICA					
	Rha	Ara	Xyl	Man	Gal	Glc
TTF-A	2,0	8,3	1,2	9,2	70,8	8,5
TTF-A1	tr	5,2	1,8	7,2	79,3	6,5
TTF-A2	7,2	8,5	3,2	9,6	56,5	15,0
TTF-A3	1,0	-	-	4,0	93	2,0
TTF-A5	tr	-	-	1,5	98	Tr
TTF-B	4,1	9,5	3,2	14,8	68,0	2,5
TTF-C	3,7	4,3	4,5	12,2	70,6	4,7

*-Por GC-MS, como acetatos de alditóis, coluna DB-225, temp. 50°C → 220°C a 40°C/min.

Primeiramente a fração TTF-A foi submetida a um processo de congelamento e degelo, resultando em duas frações. A fração precipitado de congelamento e degelo foi denominada TTF-A2, e apresentou um rendimento de 2,32 % (1,23 g), sendo reservada para posterior estudo dos polissacarídeos insolúveis em água fria. A fração sobrenadante foi denominada TTF-A1 e apresentou um rendimento de 5,35 % (2,84g).

A composição monossacarídica de TTF-A1 apresentou a galactose como principal monossacarídeo (79%) (tabela 4.7). Pelo excesso de pigmentação verde a fração TTF-A1 foi submetida a uma precipitação com ácido tricloroacético (solução final 5%), uma vez que a clorofila, principal pigmento presente em organismos fotossintetizantes, encontra-se associado à proteínas.

O precipitado obtido pela precipitação com TCA foi retirado por centrifugação, dializado e liofilizado, originando a fração TTF-A4 (2,7 %, 1,45 g). O sobrenadante foi neutralizado com hidróxido de potássio, concentrado, dializado e liofilizado. A fração originada foi nomeada TTF-A3, apresentou um rendimento de 0,98 % (0,52 g). Sua composição monossacarídica apresentou novamente a galactose (93%) como monossacarídeo majoritário.

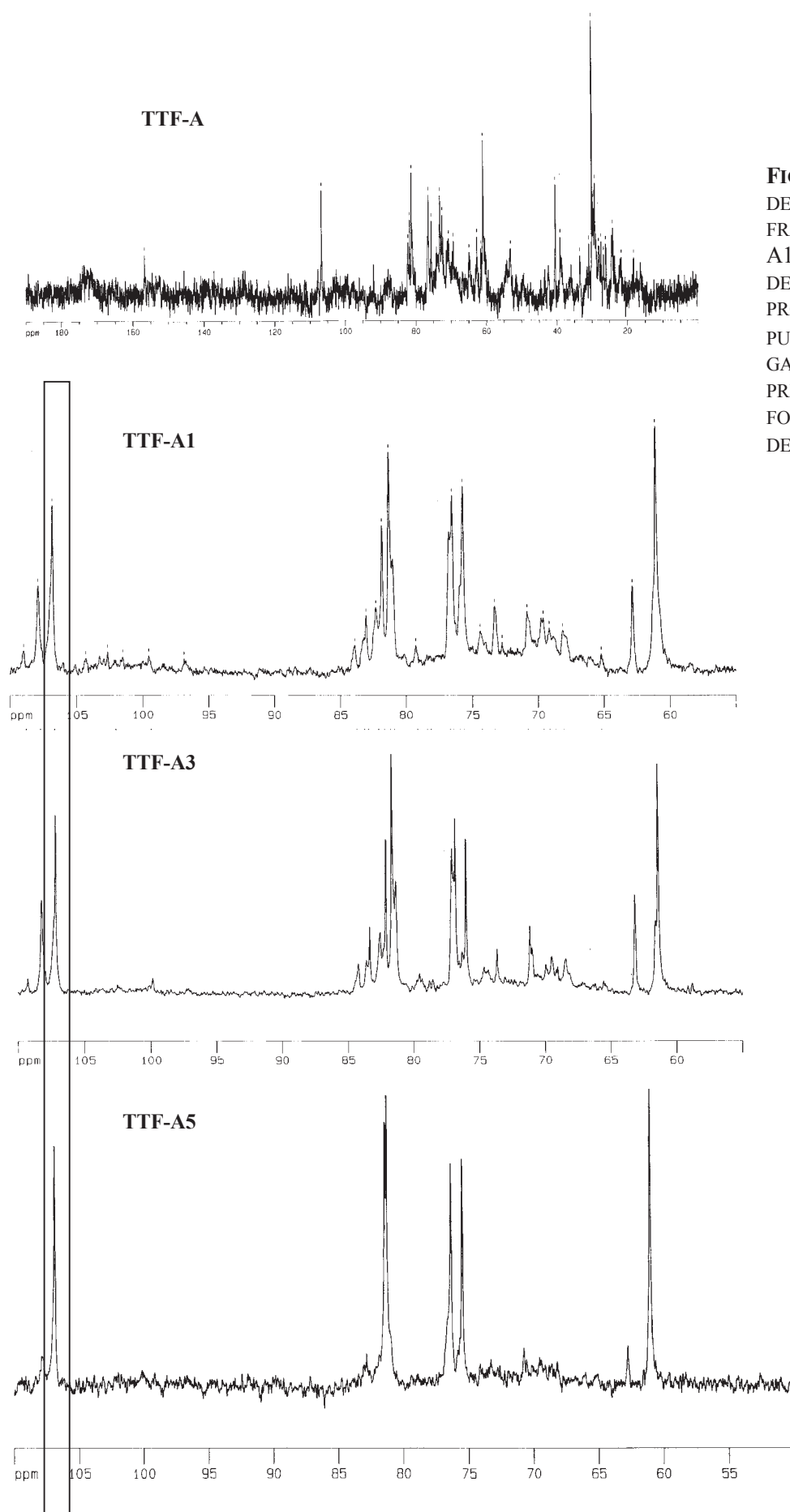
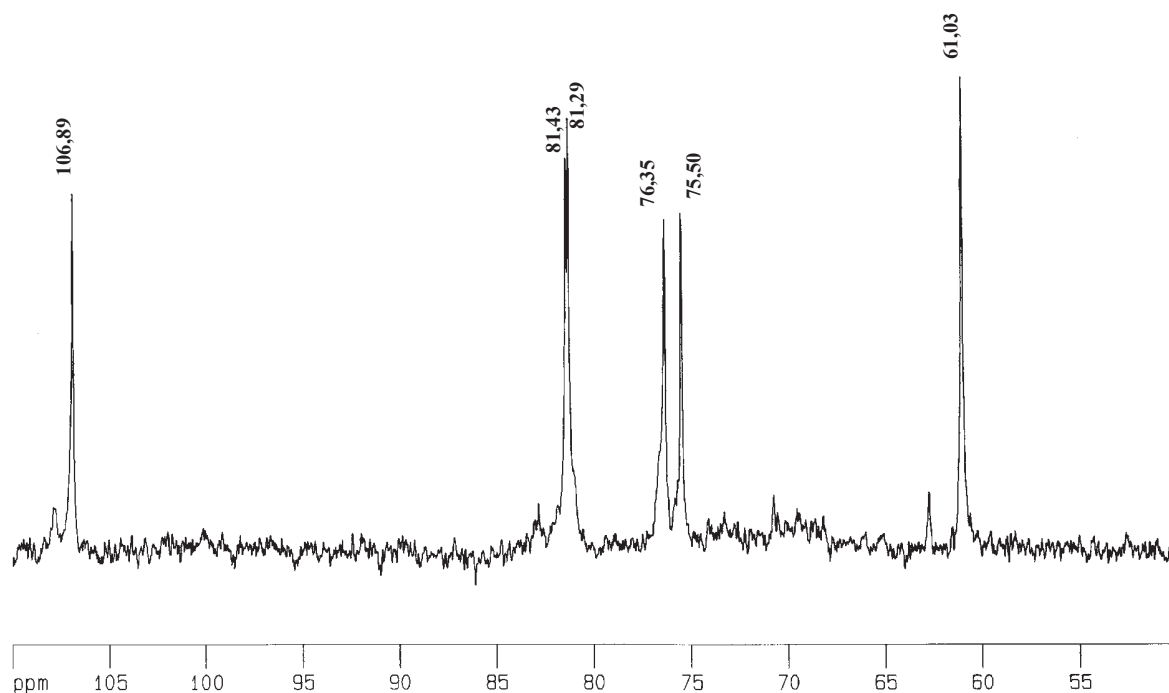


FIGURA 4.13: ESPECTRO DE RMN ^{13}C DAS FRAÇÕES TTF-A, TTF-A1, TTF-A3 E TTF-5, DEMONSTRANDO O PROCESSO DE PURIFICAÇÃO DA β -GALCTOFURANANA PRESENTE NO FOTOBIONTE ISOLADO DE *T. flavicans*.

A fração TTF-A3 foi submetida a um novo processo de purificação, utilizando-se filtração através de uma membrana com limite de exclusão de 10.000 Da. A fração retida na membrana (TTF-A4) foi reservada para estudos posteriores, já a fração eluída (TTF-A5) foi analisada quanto a seus polissacarídeos. O processo de purificação da fração TTF-A5 foi acompanhado por espectroscopia de RMN de ^{13}C , e está apresentado na figura 4.13.

A fração de estudo (TTF-A5) apresentou um rendimento de 0,17% (0,093g) e mostrou-se constituída basicamente de galactose (98%), sugerindo a presença de uma galactana como polissacarídeo. O espectro de RMN ^{13}C da fração apresentou apenas seis sinais (figura 4.14), o que caracteriza a presença de um homopolissacarídeo, no caso de galactose. A presença de um assinalamento em δ 106,9 indica que se trata de unidades de galactose na forma furanosídica.

FIGURA 4.14: ESPECTRO DE RMN ^{13}C DA FRAÇÃO TFM-D2, APRESENTANDO A β -GALACTOFURANANA (1 \rightarrow 5)-LIGADA. DESLOCAMENTOS QUÍMICOS EM (δ) PPM, SOLVENTE D_2O .



No intuito de confirmar se as galactoses presentes na molécula apresentam uma estrutura furanosídica, bem como analisar o tipo de ligação presente na molécula, foi

realizado a metilação da molécula da fração TTF-A5. A análise de metilação indicou a presença exclusiva de unidades de Galf 5-*O*-substituídas. Sendo assim, a partir dos resultados apresentados pode-se concluir que o polissacarídeo presente na fração TTF-A5 (solúvel) do fotobionte do líquen *T. flavicans* consiste de uma galactofuranana com ligações do tipo (1→5).

Este polímero já foi descrito para o fotobionte do líquen *Ramalina peruviana*, o que é também uma alga verde do gênero *Trebouxia* (CORDEIRO, 2004b; CORDEIRO et al., 2005). TAKAHASHI e colaboradores (1979), em estudo de análise comparativa de polissacarídeos solúveis entre o líquen e seus biontes isolados, haviam descrito a presença de galactose como monossacarídeo predominante do polissacarídeo solúvel do fotobionte. E em contrapartida a glucose havia sido encontrada nas mesmas frações no micobionte.

CORDEIRO (2004b) observou ainda a presença uma galactana furanosídica para o fotobionte do líquen *Cladina confusa*, uma alga verde do gênero “*Asterochloris*”. Porém a estrutura deste polissacarídeo é diferente daquela observada para a galactofuranana isoladas dos fotobiontes dos líquens *T. flavicans* e *R. peruviana* (CORDEIRO, 2004b; CORDEIRO et al., 2005). A galactofuranana do fotobionte de *C. confusa* apresenta ligações do tipo (1→5) e (1→6) (CORDEIRO, 2004b)

KÖNING e PEVELING (1984) descreveram a presença de uma estrutura de parede diferenciada para os fotobiontes de *Pseudotreboxia* (atualmente *Trebouxia*) e *Trebouxia* (atualmente *Asterochloris*). As paredes celulares destes fotobiontes apresentam em sua ultima camada polissacarídeos específicos de reconhecimento. Os quais podem ser constituídos de galactose.

Os trabalhos de CORDEIRO (CORDEIRO, 2004b; CORDEIRO et al., 2005) foram os primeiros a reportar a presença de galactofurananas para algas. Estas moléculas eram, até então, exclusivas de fungos, tendo sido observadas em *Penicilium* (PARRA et al., 1994), *Eupenicilium* (LEAL et al., 1993a, b), *Neosartorya* (LEAL et al., 1995), *Aspergillus* (LEAL et al., 1992) e *Guignardia* (SASSAKI et al., 2002). Estas β-galactofurananas fúngicas apresentam uma variedade de estruturas, desde cadeias lineares (1→5)-ligadas, alternadas (1→5),(1→6)-ligadas, bem como apresentando estruturas ramificadas.

Unidades de galactofuranose são conhecidas como altamente imunogênicas. E comumente encontradas em glicolipídeos de fungos, sugerindo que estas desempenhem um

papel importante no reconhecimento (TOLEDO et al., 1999). Outra constatação importante é que vários fungos que apresentam galactofurananas são organismos que apresentam algum tipo de simbiose, sendo o mais comum o parasitismo (LEAL et al., 1995; SASSAKI et al., 2002). Finalmente, experimentos envolvendo lectinas demonstraram a capacidade dos fotobiontes de líquens ao se ligarem a lectinas que apresentam como especificidade a galactose (MARX & PEVELING, 1983; MOLINA & VICENTE, 1996). A compilação das informações permite sugerir que estes polissacarídeos desempenham algum papel no específico reconhecimento entre o micobionte e o fotobionte.

4.5. Conclusão:

As principais conclusões obtidas como resultados deste trabalho são:

- O micobionte de *T. flavicans* apresenta como polissacarídeos constituintes duas glucanas:
Uma α -D-glucana com ligações do tipo (1 \rightarrow 4)(1 \rightarrow 6) na relação molar de 1:1, denominada pululana.
Uma β -D-glucana com ligações do tipo (1 \rightarrow 3)(1 \rightarrow 6) na relação molar de 2:1.
- O fotobionte de *T. flavicans* apresenta uma galactofuranana com ligações do tipo β -(1 \rightarrow 5). Idêntica àquela isolada para o fotobionte do líquen *Ramalina peruviana* (*Trebouxia*).
- As duas glucanas apresentadas no líquen *T. flavicans* foram observadas no micobionte isolado.

Considerações Finais

A análise filogenética dos fotobiontes de líquens (Capítulo 1) demonstrou a presença de linhagens tropicais tanto para a história evolutiva de *Trebouxia* como *Asterochloris*. Dentro da história evolutiva de *Asterochloris* verifica-se que todas as amostras apresentam-se reunidas em um mesmo clado, entretanto este não é exclusivo de amostras tropicais.

A árvore evolutiva de *Trebouxia* apresenta quatro cladogramas principais, nomeados A, I, S, e G. Dentro desta história evolutiva de *Trebouxia* pode-se observar a presença de duas linhagens tropicais, uma no Clado I e outra no Clado G. Este pode ser considerada como um clado exclusivamente tropical, apresentando a grande maioria das amostras originadas das regiões tropicais, sendo, o restante destas presentes no Clado I. É plausível sugerir uma seletividade presente tanto para fotobiontes do Clado G como do Clado I, por exemplo, uma vez que os fotobiontes do Clado I são quase que exclusivamente encontrados em fotobiontes do gênero *Heterodermia* e, além disto, certos padrões de seletividade, seja por táxon, ou ambiente são encontrados no Clado G.

A análise filogenética dos fotobiontes, tanto para *Asterochloris* como *Trebouxia*, demonstrou a presença de linhagens tropicais, as quais podem representar novas espécies não antes descritas. Desta maneira o isolamento destes fotobiontes e conseqüente descrição de seus ciclos de vida e morfologia se faz necessário.

Sendo assim o capítulo 2 vem apresentar o isolamento e cultivo dos seguintes fotobiontes de líquens: *Cladonia ceratophylla*, *Cladonia* sp. (137), *Ramalina peruviana* e *Cladia aggregata* e *Ramalina celastri* e *Teloschistes flavicans*. A análise morfológica dos destas culturas demonstrou a impossibilidade da descrição de novas espécies, fazendo-se necessário mais dados para tal, como por exemplo, ultra-estrutura de pirenóides e cloroplasto.

Além dos fotobiontes, foi apresentado também o isolamento de micobiontes dos líquens *Teloschistes flavicans*, *Xanthoria parietina* *Cladonia ceratophylla*, *Cladonia* sp. (137), *Ramalina peruviana* e *Siphula pteruloides*. A escolha dos taxa selecionados para este procedimento justifica-se por estes apresentarem facilidades em seu cultivo, seja pela coloração de seus esporos ou pelas altas taxas de crescimento, tanto para esporos como

fragmentos de talo. Todos os simbiontes isolados durante este trabalho encontram-se agora disponíveis para futuras análises de seus constituintes químicos.

Dos líquens que tiveram seus simbiontes submetidos ao processo de isolamento e cultivo, podemos ressaltar o ascolíquen *Teloschistes flavicans*, o qual já foi objeto de estudos, quanto a seus polissacarídeos, no Laboratório de Química de Carboidratos da UFPR (REIS, 2001; REIS et al., 2002). O isolamento de ambos simbiontes de *T. flavicans* permitiu análises comparativas, com relação à composição de ácidos graxos e polissacarídeos entre o líquen e seus imbiontes (Capítulos 3 e 4). Os resultados obtidos para os ácidos graxos e polissacarídeos de *T. flavicans* demonstraram um padrão de distribuição interessante de ser analisado.

Com relação aos polissacarídeos (Capítulo 4) pode-se ressaltar a obtenção das seguintes moléculas para o micobionte: uma α -D-glucana com ligações do tipo (1 \rightarrow 4)(1 \rightarrow 6) na relação molar de 1:1, denominada pululana e uma β -D-glucana com ligações do tipo (1 \rightarrow 3)(1 \rightarrow 6) na relação molar de 2:1. Sendo interessante ressaltar que estas duas glucanas já haviam sido previamente descritas para o líquen *T. flavicans*.

Para o fotobionte de *T. flavicans* foi observado a presença de uma galactofuranana com ligações do tipo β -(1 \rightarrow 5). Idêntica àquela isolada para o fotobionte do líquen *Ramalina peruviana* (*Trebouxia*).

Com relação aos ácidos graxos (Capítulo 3), o mesmo perfil não foi observado, ou seja, não houve relação entre a composição de ácidos graxos do líquen com a de seus simbiontes em cultivo. Este resultado pode ser explicado, pois a composição de ácidos graxos é altamente influenciada por fatores externos como, por exemplo, temperatura e luminosidade e a simbiose.

Além disso, foi observado que o líquen *T. flavicans* apresenta no verão uma concentração de ácidos graxos saturados maior daquela observada no inverno. Sobre estes resultados, quando os experimentos foram extrapolados para o laboratório verificamos que diferenças nas condições de cultivo, como temperatura e luminosidade alteram o teor de insaturação presente nos ácidos graxos do micobionte de *T. flavicans* em cultivo.

A análise conjunta dos Capítulos 3 e 4 apresentam uma visão, que embora não seja nova, mostra-se interessante, principalmente quando se trata de uma relação simbiótica:

O metabolismo de ácidos graxos, ao contrário do de polissacarídeos, pode ser considerado influenciado pela simbiose. Sendo assim, podemos sugerir a composição final de ácidos graxos com uma resposta do líquen, enquanto que a de polissacarídeos como particular de seus simbiontes.

Desta maneira o estudo de ácidos graxos se mostra como uma importante ferramenta para estudos fisiológicos que levem em consideração a simbiose, como por exemplo, respostas ambientais ou a determinado agente externo (temperatura, UV).

Por outro lado, podemos considerar os polissacarídeos como boas ferramentas para serem analisados em relação ao processo de reconhecimento entre estes dois organismos, especialmente quando focado em um possível estudo de modelagem de parede celular.

Talvez a maior virtude não tenha sido as respostas obtidas, mas sim o número de novas questões que ele originou. O estudo de líquens, seja em uma abordagem filogenética, filogeográfica, química ou com relação aos mecanismos envolvidos nesta intrínseca simbiose, ainda encontra-se aberto e cheio de oportunidades a serem desenvolvidas.

5. Referências Bibliográficas

AHMADJIAN, V. A guide to the algae occurring as lichen symbionts: Isolation, culture, cultural physiology and identification. **Phycologia**, Oxford, v.6, p. 127-160, 1967.

AHMADJIAN, V. Artificial reestablishment of the lichen *Cladonia cristatella*. – **Science**, 15: 199-201. 1966.

AHMADJIAN, V. Methods of isolating and culturing lichen symbionts and thalli. In: AHMADJIAN, V.; HALE, M. E., (Ed) **The Lichens**. New York: Academic Press, p. 653-659. 1973.

AHMADJIAN, V. Some new and interesting species of *Trebouxia*, a genus of lichenized algae. **Am. J. Bot.**, v. 47, p. 677-683, 1960.

AHMADJIAN, V. **The Lichen Symbiosis**. New York: John Wiley & Sons, 250 pp. 1993.

AHMADJIAN, V.; JACOBS, J. B. Relationship between fungus and algae in the lichen *Cladonia cristatella* Tuck. **Nature**, v. 289, p. 169-172, 1981.

ALMBORN, O. Revision of the lichen genus *Teloschistes* in central and southern Africa. **Nord. J. Bot.**, v.8, n.5, p. 521-537, 1989.

APTROOT., A. Aspects of the integration of the taxonomy of lichenized and non-lichenized pyrenocarpous ascomycetes. **Lichenologist** 30: 501-514.1998.

ARCHIBALD, P. A. *Trebouxia* de Puymaly (Chlorophyceae, Chlorococcales) and *Pseudotrebouxia* gen. Nov. (Chlorophyceae, Chlorosarcinales). **Phycology**, v. 14, p. 125-137, 1975.

BECK, A., FRIEDL, T. AND RAMBOLD, G. Selectivity of photobiont choice in a defined lichen community: inferences from cultural and molecular studies. **New Phytol.** 139, 709-720, 1998.

BECK, A., KASALICKY, T. AND RAMBOLD, G. The myco-photobiontal selection in a Mediterranean cryptogam community with *Fulgensia fulgida* and considerations on research strategies focussing on the selectivity of lichen bionts. **New Phytol.** 153, 317-326, 2002.

BERZELIUS, J. J. Versuche über die Mischung des Isländischen Moores und seine Anwendung als Nahrungsmittel. **J. Chem. Phys.**, v. 7, p. 317-353, 1815.

BHATTACHARYA, D., FRIEDL, T. AND DAMBERGER, S. Nuclear-encoded rDNA group I introns: Origin and phylogenetic relationships of insertion site lineages in the green algae. **Molecular Biology and Evolution**, v. 13, n. 7, p. 978–989, 1996.

BOISSIÈRE, J. C. Ultrastructural relationship between the composition and the structure of the cell wall of the mycobiont of two lichens. In.: PEVELING, E., (Ed.). Progress and problems in lichenology in the Eighties. **Biblioteca Lichenologica**, v. 25, p. 117-132. Berlin, Stuttgart: Cramer. 1987.

BRODO, I.M., DURAN, SHARNOFF, S., SHARNOFF, S. **Lichens of North America**. - Yale University Press, New Haven & London. 795 pp. 2001

BUBBRICK, P. Methods for cultivating lichens and isolated bionts. In: GALUN, M. (Ed.) **CRC Handbook of Lichenology**. Vol. III. Boca Raton: CRC Press, p. 127-138, 1988.

BUBRICK, P., BEN-YAAKOV, M., FRENSDORFF, A., GALUN, M. Lichen symbiosis: does the surface of the phycobiont's cell wall play a role in discrimination between compatible and incompatible symbionts?. - **Israel Journal of Botany**, 32: 47-48. 1983.

BUBRICK, P., GALUN, M., BEN-YAACOV, M., FRENSDORFF, A. Antigenic similarities and differences between symbiotic and cultured phycobionts from the lichen, *Xanthoria parietina*. - **FEMS Microbiology Letters** 13: 435-438. 1982.

BUBRICK, P., GALUN, M., FRENSDORFF, A. Proteins from the lichen *Xanthoria parietina* which bind to phycobiont cell walls. Localization in the intact lichen and cultured mycobiont. - **Protoplasma** 105: 207-211. 1981.

BYCHECK-GUSHCHINA, I.A. Study of biochemical aspects of lichen symbiosis. I. Lipids and fatty acids in cultured lichen symbionts. **Biochemistry (Moscow)** 62(5), 490-494. 1997.

BYCHEK, I.A., BYCHEK, E.A. Lipids and fatty acids of the lichen *Umbilicaria virginis* Schaer. at different stages of its ontogeny. - **Biochemistry (Moscow)** 61(5): 590-593. 1996.

BYCHEK, I.A., BYCHEK, E.A., Effect of illumination conditions on lipid and fatty acid composition of lichen *Parmelia tinctoria* **Biochemistry (Moscow)** 61(4): 457-460. 1996.

CALATAYUD, A.; GUERRA, A.; FOS, S.; BARRERO, E. A new method to isolate lichen algae by using Percoll® gradient centrifugation. **Lichenologist (Lond.)**, v. 33, n. 4, p. 361-366, 2001.

CARBONERO, E. R.; SASSAKI, G. L.; STUELP, P.; GORIN, P. A. J.; WORANOVICZ-BARREIRA, S. M.; IACOMINI, M. Comparative studies of the polysaccharides isolated from lichenized fungi of the genus *Cladonia*: significance as chemotypes. **FEMS microbiol. Lett.**, v.194, p.65-69, 2001.

CARNEIRO-LEAO, A. M. A.; FREITAS BUCHI, D.; IACOMINI, M.; GORIN, P. A. J. & OLIVEIRA, M. B. M. Cytotoxic effect against *HeLa* cells of polysaccharides from the lichen *Ramalina celastri*. **Journal Submicroscopy Cytology and Pathology**, v. 29, p. 503-509, 1997.

CIUCANU, I.; KEREK, F. A simple and rapid method for the permethylation of carbohydrates. **Carbohydr. Res.**, Amsterdam, v. 131, p. 209-217, 1984.

CORDEIRO, L. M. C. **Caracterização estrutural de polissacarídeos extraídos do fotobionte isolado do líquen *Ramalina celastri***. Curitiba, 99 pp. Dissertação de Mestrado. Departamento de Bioquímica - Setor de Ciências Biológicas, Universidade Federal do Paraná. 2000.

CORDEIRO, L. M. C. **Isolamento em culturas axênicas de simbioses líquênicas e caracterização estrutural de seus polissacarídeos**. Curitiba, 198 pp. Tese de Doutorado. Departamento de Bioquímica - Setor de Ciências Biológicas, Universidade Federal do Paraná. 2004.

CORDEIRO, L. M. C.; CARBONERO, E.R, SASSAKI, G.L., REIS, R.A., STOCKER-WÖRGÖTTER, E., GORIN, P. A. J., IACOMINI, M. A fungus-type beta-galactofuranan in the cultivated *Trebouxia* photobiont of the lichen *Ramalina gracilis*. **FEMS Microbiol Lett.** Mar 1;244(1):193-8. 2005.

CORDEIRO, L. M. C.; REIS, R.; TISCHER, C. A.; GORIN, P. A. J.; FERREIRA, J. C.; IACOMINI, M. Linear β -mannose-containing polysaccharide, β -xylan, and amylose from the cultured photobiont *Trebouxia* sp. of the ascolichen *Ramalina celastri*. **FEMS Microbiology Letters**, 220: 89-94. 2003a.

CORDEIRO, L. M. C.; STOCKER-WÖRGÖTTER, E., GORIN, P. A. J., IACOMINI, M. Elucidation of polysaccharide origin in *Ramalina peruviana* symbiosis. **FEMS Microbiology Letters**, 238: 79-84. 2004a.

CORDEIRO, L. M. C.; STOCKER-WÖRGÖTTER, E.; GORIN, P. A. J.; IACOMINI, M. Comparative studies of the polysaccharides from species of the genus *Ramalina*-lichenized fungi- of three distinct habitats. **Phytochemistry**, 63: 967-975. 2003b.

CORDEIRO, L.M.C., IACOMINI, M. STOCKER-WÖRGÖTTER, E.. Culture studies and secondary compounds of six *Ramalina* species. **Mycological Research** 108 (5), 489-497. 2004c.

CORRADI DA SILVA, M. D. L. **Estudo de alguns carboidratos dos líquens *Sticta* sp. e *Parmotrema cetratum* (Ach.) Hale**. Curitiba, 157 pp. Tese de Doutorado em Bioquímica – Setor de Ciências Biológicas, Universidade Federal do Paraná, 1992.

CRITTENDEN, P. D., DAVID, J. C. HAWKSWORTH, D. L., CAMPBELL, F. S., Attempted Isolation and success in the culturing of broad spectrum of lichen-forming and lichenicolous fungi. **New Phytologist**, 130 (2), p. 267-297, 1995.

CUBERO, O.F., CRESPO, A., FATEHI, J., BRIDGE, P.D.. DNA extraction and PCR amplification method suitable for fresh, herbarium-stored, lichenized, and other fungi. **Plant Systematics and Evolution**. 216 (3-4), 243-249. 1999.

DAHLKILD, Å., KÄLLERSJÖ, M., LOHTANDER, K., TEHLER, A. Photobiont diversity in *Physciaceae* (Lecanorales). **The Bryologist** 104, 527-536. 2001.

DEBARY, A. Morphologie und Physiologie der Pilze, Flechten und Myxomyceten. In: HOFMEISTER, W. **Handbuch der physiologischen Botanik**. Engelmann 316pp 1866.

DEMBITSKY, V. M., REZANKA, T., BYCHECK, I. A. Seasonal variation of lipids and fatty acids from tree-growing lichens of the genus *Physcia*. **Phytochemistry** 36 (3): 601-608. 1994b.

DEMBITSKY, V.M., REZANKA, T., BYCHECK, I.A. Seasonal variability of lipids and fatty acids in the tree-growing lichen *Xanthoria parietina* L. **Journal of Experimental Botany**, v. 45 (272), 403-408, 1994a.

DEMBITSKY, VM, BYCHECK, IA, SHUSTOV, MV, ROZENTSVET, OA Phospholipid and fatty acid composition of some lichen species. - **Phytochemistry** 30(3): 837-839. 1991.

DEMBITSKY, VM, REZANKA, T, BYCHECK, IA. Lipid composition of some lichens. - **Phytochemistry** 31(5): 1617-1620. 1992b.

DEMBITSKY, VM, REZANKA, T., BYCHECK, IA. Fatty acids and phospholipids from lichens of the order Lecanorales. - **Phytochemistry** 31(3): 851-853, 1992a.

ETTL, H., GÄRTNER, G. **Syllabus der Boden-, Luft- und Flechtenalgen**. Stuttgart: Gustav Fischer Verlag. 1995.

FAMINTZIN, A.; BARANIETZKY, J. Beitrag zur Entwicklungsgeschichte und der Gonidien und Zoosporenbildung bei *Physcia parietina*. Vorläufige Mitteilung. **Botanische Zeitung**, v. 25, p. 189-190, 1867.

FRIEDL T, BESENDAHL, A., PFEIFFER, P., BHATTACHARYA, D. The distribution of Group I introns in lichen algae suggests that lichenization facilitates intron lateral transfer. **Molecular Phylogenetics and Evolution**, v. 14, n. 3, p. 342-352, 2000.

FRIEDL, T. Comparative ultrastructure of pyrenoids in *Trebouxia* (Microthamniales, Chlorophyta). **Pl. Syst. Evol.** 164, 145-159. 1989a.

FRIEDL, T. Inferring taxonomic positions and testing genus level assignments in coccoid green lichen algae: a phylogenetic analysis of 18S ribosomal RNA sequences from *Dictyochloropsis reticulata* and from members of the genus *Myrmecia* (Chlorophyta, *Trebouxiophyceae* cl. Nov.). **J. Phycol.**, v. 31, p. 632-639, 1995.

FRIEDL, T. New aspects of the reproduction by autospores in the lichen alga *Trebouxia* (Microthamniales, Chlorophyta). **Arch. Protistenkd.**, v. 143, p. 153-161, 1993.

FRIEDL, T. Systematik und Biologie von *Trebouxia* (Microthamniales, Chlorophyta) als Phycobiont der *Parmeliaceae* (lichenisierte Ascomyceten). Inaugural-Dissertation, Universität Bayreuth, Germany. 1989b.

FRIEDL, T., ROKITTA, C. Species relationships in the lichen alga *Trebouxia* (Chlorophyta, Trebouxiophyceae): molecular phylogenetic analyses of nuclear-encoded large subunit rRNA gene sequences. **Symbiosis**, v. 23, p. 125-148, 1997.

FRIEDL, T.; ZELTNER, C. Assessing the relationships of some coccoid green lichen algae and the *Microthamniales* (Chlorophyta) with 18S ribosomal RNA gene sequence comparisons. **J. Phycol.**, v. 30, p. 500-506, 1994.

GALUN, M.; BRAUN, A.; FRENSDORFF, A.; GALUN, E. Hyphal walls of isolated lichen fungi. Autoradiographic localization of precursor incorporation and binding of fluorescein-conjugated lectins. **Arch. Microbiol.** V. 108, p. 9-16, 1976.

GARGAS, A.; DEPRIEST, P. T.; GRUBE, M.; TEHLER, A. Multiple origins of lichens symbiosis in fungi suggested by SSU rDNA Phylogeny. **Science**, v. 268, p.1492-1495, 1995.

GÄRTNER, G. The genus *Trebouxia* Puymaly (*Chlorelles*, *Chlorophyceae*). **Archiv für Hydrobiologie**, Suppl. 71, Algological Studies, v. 41, p. 495-548, 1985.

GOLDSMITH, S. J.; THOMAS, M. A.; GRIES, C. A. A new technique for photobionts culturing and manipulation. **Lichenologist (Lond.)**, v. 29, p. 559-569, 1997.

GORIN, P.A.J. Carbon-13 nuclear magnetic resonance spectroscopy of polysaccharides. **Adv. Carbohydr. Chem. Biochem.**, San Diego, v. 38, p. 13-104, 1981.

GORIN, P.A.J.; BARON, M.; IACOMINI, M. Storage products of lichens. In: GALUN, M. **CRC Handbook of Lichenology**. V.3, p.9-23, Florida: CRC Press, 1988.

GORIN, P.A.J.; BARON, M.; SILVA, M.L.C.; TEIXEIRA, A.Z.A.; IACOMINI, M. Lichen carbohydrates. **Ciênc. Cultura (São Paulo)**, v. 45, n. 1, p.27-36, 1993.

GORIN, P.A.J.; IACOMINI, M. Polysaccharides of the lichens *Cetraria islandica* and *Ramalina usnea*. **Carbohydr. Res.**, v.128, p.119-132, 1984.

GRUBE, M, KROKEN, S. Molecular approaches and the concept of species and species complexes in lichenized fungi. - **Mycological Research** 104(11): 1284-1294, 2000.

HALL, T. A. BioEdit: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT. **Nucl. Acids Symb.** Ser. 41: 95-98, 1999.

HAMADA, N.; MIYAGAWA, H. Secondary metabolites from isolated lichen mycobionts cultured under different osmotic conditions. **Lichenologist (Lond.)**, v. 27, p. 201-105, 1995.

HELMS, G. Taxonomy and symbiosis in associations of *Physciaceae* and *Trebouxia*. PhD thesis, Fakultät der Georg-August Universität Göttingen, Germany. Available on-line: <<http://webdoc.sub.gwdg.de/diss/2003/helms/>>. 2003.

HELMS, G., FRIEDL, T., RAMBOLD, G. AND MAYRHOFER, H. Identification of photobionts from the lichen family *Physciaceae* using algal-specific ITS rDNA sequencing. **Lichenologist**, v. 33, p. 73-86, 2001.

HIGUCHI, M.; MIURA, Y.; BOOHENE, J.; KINOSHITA, Y.; YAMAMOTO, Y., YOSHIMURA, I.; YAMADA, Y. Inhibition of tyrosinase activity by cultured lichen tissues and bionts. **Planta Medica**, v. 59, p. 253-255, 1993.

HILDRETH, K. C., AHMADJIAN, V. A study of *Trebouxia* and *Pseudotrebouxia* isolates from different lichens. **Lichenologist**, v 13, p. 65-86, 1981.

HOHNMANN, S. Osmotic stress signaling and osmoadaptation in yeasts. **Microbiology and Molecular Biology Reviews**, 66-2. 300-372. 2002.

HONEGGER, R. Functional aspects of the lichen symbiosis. - **Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology** 42: 553-578.1991.

HONEGGER, R. Mycobionts. In: NASH III, T. H. **Lichen Biology**, Cambridge, Cambridge University Press, p. 24-36, 1996.

HONEGGER, R., HAISCH, A. Immunocytochemical location of the (1->3) (1->4)-beta-glucan lichenin in the lichen-forming ascomycete *Cetraria islandica* (Icelandic moss). - **New Phytologist** 150: 739-746,2001.

HONEGGER, R.; BARTINICKI-GARCIA, S. Cell wall structure and composition of cultured mycobionts from the lichens *Cladonia macrophylla*, *Cladonia caespiticia*, and *Physcia stellaris* (Lecanorales, Ascomycetes). **Mycological Research**, v.95, p. 905-914, 1991.

HONEGGER, R., ZIPPLER, U., GANSNER, H., SCHERRER, S. Mating systems in the genus *Xanthoria* (lichen-forming ascomycetes). - **Mycological Research** 108(5): 480-488,2004.

HUELSENBECK, J. P.; CRANDALL, K. A. Phylogeny estimation and hypothesis testing using maximum likelihood. **Annual Reviews in Ecology and Systematics**, v. 28, p. 437-466, 1997.

HUELSENBECK, J. P.; RONQUIST, F. MrBayes: Bayesian inference of phylogenetic trees. **Bioinformatics**, v. 17, p. 754-755, 2001.

IACOMINI, M., REIS, R.A., SASSAKI, G.L. Polissacarídeos de liquens. In: Xavier-Filho (ed.) **Biologia de Liquens**, in press. 2005.

IACOMINI, M., ZANIN, S. M. W., FONTANA, J. D., HOGGE, L., GORIN, P. A. J. Isolation and characterization of β -D-glucan, heteropolysaccharide, and trehalose components of the basidiomycetus lichen *Cora pavonia*. **Carbohydr. Res.**, Amsterdam, v.168, p.55-65, 1987.

KÖNIG, J.; PEVELING, E. Cell walls of the phycobionts *Trebouxia* and *Pseudotrebouxia* : constituents and their localization. **Lichenologist**, v. 16, p. 129-144, 1984.

KROKEN, S.; TAYLOR, J. W. Phylogenetic species, reproductive mode, and specificity of the green alga *Trebouxia* forming lichens with the fungal genus *Letharia*. **The Bryologist**, v. 103, p. 645-660, 2000.

LEAL, J. A.; GÓMEZ-MIRANDA, B.; PRIETO, A.; BERNABÉ, M. Differences in cell wall polysaccharides of several species of *Eupenicillium*. **FEMS Microbiol. Lett.**, v. 108, p. 341-346, 1993a.

LEAL, J. A.; GUERRERO, C.; GÓMEZ-MIRANDA, B.; PRIETO, A.; BERNABÉ, M. Chemical and structural similarities in wall polysaccharides of some *Penicillium*, *Eupenicillium* and *Aspergillus* species. **FEMS Microbiol. Lett.**, v. 90, p. 165-168, 1992.

LEAL, J. A.; JIMÉNEZ-BARBERO, J.; GÓMEZ-MIRANDA, B.; PARRA, E.; PRIETO, A.; BERNABÉ, M. Structural investigation of cell wall polysaccharides from *Neosatorya*: relationships with their putative anamorphs of *Aspergillus*. **Carbohydr. Res.**, v. 273, p. 255-262, 1995.

LEAL, J. A.; PRIETO, A.; GÓMEZ-MIRANDA, B.; JIMÉNEZ-BARBERO, J.; BERNABÉ, M. Structure and conformational features of an alkali- and water-soluble galactofuranan from the cell walls of *Eupenicillium crustaceum*. **Carbohydr. Res.**, v. 244, p. 361-368, 1993b.

LUTZONI F, KAUFF F, COX C, McLAUGHLIN D, CELIO G, DENTINGER B, PADAMSEE M, HIBBETT D, JAMES TY, BALOCH E, GRUBE M, REEB V, HOFSTETTER V, SCHOCH C, ARNOLD AE, MIADLIKOWSKA J, SPATAFORA J, JOHNSON D, HAMBLETON S, CROCKETT M, SHOEMAKER R, SUNG GH, LÜCKING R, LUMBSCH T, O'DONNELL K, BINDER M, DIEDERICH P, ERTZ D, GUEIDAN C, HALL B, HANSEN K, HARRIS RC, HOSAKA K, LIM YW, LIU Y, MATHENY B, NISHIDA H, PFISTER D, ROGERS J, ROSSMAN A, SCHMITT I, SIPMAN H, STONE J, SUGIYAMA J, YAHR R, VILGALYS R, Assembling the fungal tree of life: progress, classification, and evolution of subcellular traits. **Amer. J. Bot.** 91: 1446-1480. 2004.

LUTZONI, F., PAGEL, M. REEB, V. Major fungal lineages are derived from lichen symbiotic ancestors. - **Nature** 411: 937-940, 2001.

MARCELLI, M. **Fungos liquenizados**: Taxonomia e características de importância taxonômica. Curitiba: UFPR, Departamento de Botânica, Apostila, 1995.

MELKONIAN, M.; PEVELING, E. Zoospore ultrastructure in species of *Trebouxia* and *Pseudotrebouxia* (*Chlorophyta*). **Pl. Syst. Evol.**, v. 158, p. 183-210, 1988.

- MOLINA, M. C., CRESPO, A.; VICENTE, C.; ELIX, J. A. Differences in the composition of secondary metabolites and fatty acids extracted from axenically cultured mycobiont and lichenized thalli of *Physconia distorta*. **Plant Physiology and Biochemistry**, v. 41, p. 175-180, 2003.
- MOLINA, M.C., VICENTE, C., PEDROSA, M.M., MUNIZ, E. Binding of a labelled lectin from the lichen *Xanthoria parietina* to its own phycobiont and analysis of its enzymatic activity. **PHYTON**, 36-1. 145-158. 1996.
- NASH III, T. H. Introduction In: NASH III, T. H. **Lichen Biology**, Cambridge, Cambridge University Press, p. 1-7, 1996.
- NYLANDER, J. A. A. MrModeltest v1.0b. Program distributed by the author. Department of Systematic Zoology, Uppsala University, 2002.
- OLAFSDOTTIR, E.S., INGÓLFSDOTTIR, K. Polysaccharides from lichens: structural characteristics and biological activity. - **Planta Medica** 67: 199-208, 2001.
- PAGE, R. D. TreeView: an application to display phylogenetic trees on personal computers. **Computational Applied Biosciences**, v. 12, p. 357-358, 1996.
- PALMQVIST, K. Carbon economy of lichens. - **New Phytologist** 148: 11-36. 2000.
- PARRA, E.; JIMÉNEZ-BARBERO, J.; BERNABE, M.; LEAL, J. A.; PRIETO, A.; GÓMEZ-MIRANDA, B. Structural investigation on two cell-wall polysaccharides of *Penicillium expansum* strains. **Carbohydr. Res.**, v. 257, p. 239-248, 1994.
- PAULSEN, B.S., OLAFSDÓTTIR, E.S., INGÓLFSDOTTIR, K. Chromatography and electrophoresis in separation and characterization of polysaccharides from lichens. - **Journal of Chromatography A** 967(1): 163-171.2002.
- PÉREZ, M. J.; VICENTE, C.; LEGAZ, M. E. An improved method to isolate lichen algae by gel filtration. **Plant Cell Reports**, v. 4, p. 210-211, 1985.
- PIERCEY-NORMORE, M. D.; DEPRIEST, P. T. Algal switching among lichen symbioses. **Am. J. Bot.**, v. 88, p. 1490-1498, 2001.
- PIERVITTORI, R.; ALESSIO, F.; MAFFEI, M. Fatty acid variations in the lichen, *Xanthoria parietina*. **Phytochemistry**, v. 36 (4), p.853-856, 1994.
- PIERVITTORI, R.; ALESSIO, F.; USAI, L.; MAFFEI, M. Seasonal variations in lipids of *Xanthoria parietina* growing at high elevations. **Phytochemistry**, v. 40 (3), p.717-723, 1995.
- POELT, J. **Classification**. - In: V. AHMADJIAN & M. E. HALE (eds.): **The Lichens**. Academic Press, New York and London, pp. 599-632. 1973.

PRADO, S. R. T.; GORIN, P. A. J.; STUELP, P. M.; HONDA, N. K.; IACOMINI, M. An unusual juxtaposition of polysaccharides components of *Collema leptosporum*. **Carbohydr. Polym.** V.40, p.271-276, 1999.

PUMALY, A. **Recherches sur les algues vertes aériennes**. Thèse. Fac. Sci. Univ. Paris, Ser. A. N991. 274 pp, Bordeaux.1924.

PURVIS, W. **Lichens**. - Natural History Museum, London/Smithsonian Institution, London, Washington D.C.. 112 Pp. 2001.

RAMBOLD, G.; FRIEDL, T.; BECK, A. Photobionts in lichens: possible indicators of phylogenetic relationships? **The Bryologist**, v. 101, n. 3, p. 392-397, 1998.

Reis, R.A. **Caracterização estrutural das glucanas presentes no fungo liquenizado *Teloschistes flavicans* Norman**. . Curitiba, 75 pp. Dissertação de Mestrado. Departamento de Bioquímica - Setor de Ciências Biológicas, Universidade Federal do Paraná. 2001.

REIS, R. A; TISCHER, C. A; GORIN, P.A.J; IACOMINI, M. A new pullulan and a branched (1→3)-, (1→6)-linked beta-glucan from the lichenised ascomycete *Teloschistes flavicans*, **FEMS Microbiology Letters**, Volume 210, p.1-5, 2002.

RICHARDSON, D. H. S.; SMITH, D. C.; LEWIS, D. H. Carbohydrate movement between the symbionts of lichens. **Nature (Lond.)**, v. 214, 1967.

RIKKINEN, J., OKSANEN, I. AND LOHTANDER, K. Lichen guilds share related cyanobacterial symbionts. **Science** 297(5580), 357,2002.

ROMEIKE, J.; FRIEDL, T.; HELMS, G.; OTT, S. Genetic diversity of algal and fungal partners in four species of *Umbilicaria* (Lichenized Ascomycetes) along a transect of the Antarctic peninsula. **Molecular Biology and Evolution**, v. 19, p. 1209-17, 2002.

ROSSO M.L., BERTONI M.D., ADLER M.T., MAIER M.S. Anthraquinones from the cultured lichen mycobionts of *Teloschistes exilis* and *Caloplaca erythrantha*. **Biochemical Systematics and Ecology**, 31-10. pp. 1197-1200, 2003.

SASSAKI, G. L.; CRUZ, L. M.; GORIN, P. A. J.; IACOMINI, M. Fatty acid composition of lipids present in selected lichenized fungi: a chemotyping study. **Lipids**, v. 36 (2), p.167-174, 2001.

SASSAKI, G. L.; FERREIRA, J. C.; GLIENKE-BLANCO, C.; TORRI, G.; DE TONI, F.; GORIN, P. A. J.; IACOMINI, M. Pustulan and branched β -galactofuranan from the phytopathogenic fungus *Guignardia citricarpa*, excreted from media containing glucose and sucrose. **Carbohydr. Polym.**, 48: 385-389.2002.

SCHLARMANN, G. Cytochemical investigations in cell walls of two ascomycetous mycobionts. In: PEVELING, E. (Ed.). **Progress and problems in lichenology in the Eighties**. Biblioteca Lichenologica, Berlin, Stuttgart: Cramer, p. 133-135, 1987.

Schlenk H., Gellerman J.L. Arachidonic, 5,11,14,17-Eicosatetraenoic and Related Acids in Plants - Identification of Unsaturated Fatty Acids. **J. Am. Oil Chem. Soc.** 42, No. 6, 504-511. 1965.

SCHWENDENER, S. Ueber die wahre Natur der Flechten. **Verh. Schweiz. Naturf. Ges.** 1867, 88-90. S. 1867.

SHAH, S. K.; SHUKLA, A. C.; DIKSHIT, A.; UPERTI, D. K. Broad spectrum antifungal properties of the lichen *Heterodermia leucomela*. **Lichenologist (Lond.)**, v. 33, p. 177-179, 2001.

SHARNOFF; SHARNOFF, biology of lichens. Disponível em: <<http://www.lichen.com/biology.html>>. Acesso em 01. 05. 2001.

SOLHAUG, K.A., GAUSLAA, Y., NYBAKKEN, L., BILGER, W. UV-induction of sun-screening pigments in lichens. - *New Phytologist* **158(1)**: 91-100, 2003.

STOCKER-WÖRGÖTTER, E. Experimental cultivation of lichens and lichen symbionts. **Can. J. Bot.** 73 (suppl.1): P.579-589. Canadá, 1995.

STOCKER-WÖRGÖTTER, E. Experimental studies of the lichen symbiosis: DNA-analyses, differentiation and secondary chemistry of selected mycobionts, artificial resynthesis of two and tripartite symbioses. **Symbiosis**, v. 30, p. 207-227, 2001.

STOCKER-WÖRGÖTTER, E. Laboratory cultures of selected lichen fungi from Brazil and Chile. *Mitteilungen aus dem Institut für Allgemeine Botanik in Hamburg*, v. 30, p. 253-270, 2002.

STOCKER-WÖRGÖTTER, E. Resynthesis of Photosymbiodemes. In: KRANER, I.; BECKETT, R.P.; VARMA, A. K. (Eds.) **Protocols in Lichenology: Culturing, Biochemistry, Ecophysiology and Use in Biomonitoring**. Berlin:Springer Verlag,. p. 47-60. 2002.

STOCKER-WÖRGÖTTER, E.; ELIX, J. A. Secondary chemistry of cultured mycobionts: formation of a complete chemosyndrome by the lichen fungus of *Lobaria spathulata*. **Lichenologist (Lond.)**, v. 34, p. 351-359, 2002.

STUELP-CAMPELO, P. M. A.; OLIVEIRA, M. B. M.; CARNEIRO-LEAO, A. M. A.; CARBONERO, E. R.; GORIN, P. A. J. & IACOMINI, M. Effect of a soluble α -D-glucan from the lichenized fungus *Ramalina celastri* on macrophage activity. **International Immunopharmacology**, v. 2, p. 691-698, 2002.

TAKAHASHI, K.; TAKEDA, T.; SHIBATA, S. Polyssaccharides of lichen symbionts. **Chem. Pharm. Bull. (Tokyo)**, v. 27, p. 238-241, 1979.

TEHLER, A. Systematics, phylogeny and classification. In: NASH III, T. H. **Lichen Biology**, Cambridge, Cambridge University Press, p. 217-239, 1996.

TORRES, A.; DOR, I.; ROTEM, J.; SREBNIK, M.; DEMBITSKY, V. M. Characterization of surface n-alkanes and fatty acids of the epiphytic lichen *Xanthoria parietina*, its photobiont a green alga *Trebouxia* sp., and its mycobiont, from the Jerusalem hills. **Eur. J. Biochem**, v. 270, p.2120-2125, 2003.

TREBOUX, O. Die freilebende Alge und die Gonidie *Cystococcus humicola* in bezud auf die Flechtensymbiose. **Ber. Dt. Bot. Ges.**, v. 30, p. 69-80, 1912.

TSCHERMAK-WOESS, E. *Asterochloris phycobiontica*, nov. gen., nova spec., the phycobiont of the lichen *Varicellaria carneonivea* (Anzi) Erichs. **Pl. Syst. Evol.**, v. 135, p. 279-294, 1980.

TSCHERMAK-WOESS, E. Developmental studies in trebouxoid algae and taxonomical consequences. **Plant Systematics and Evolution**, v. 164, p. 161-195, 1989.

TSCHERMAK-WOESS, E. ÜBER die Abgrenzung der Chlorosarcinales von der Chloeoococcales. **Pl. Syst. Evol.**, v. 139, p. 295-301, 1982.

TULLOCH, A. P. Glycosides of hydroxy fatty acids. In: Handbook of Lipids Research, Vol. 6, Glycolipids, Phosphoglycolipids and Sulphoglycolipids (Kates, M. Ed.) pp.463-487. Plenum press, New York, 1990.

WAREN, H. Reinkulturen von flechtengonidien. **Öfvers. Finska Vetensk soc. Föörhhsndl.** 61, 14, 1-79.1920.

WASSEF, M. K. Fungal lipids. **Adv. Lipid Res.**, v. 15, p. 159-232, 1977.

WHITE, T. J.; BRUNS, T. D.; LEE, S.; TAYLOR, J. Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal DNA genes for phylogenies. In: INNIS, M. A, GELFAND, D. H., SNINSKY, J. J., WHITE, T. J., (EDS.). **PCR Protocols: A guide to methods and applications**. pp. 345-322. Academic Press: San Diego, 1990.

WOLFROM, M. L.; THOMPSON, A. Reduction with sodium borohydride. In: WHISTLER, R. L.; WOLFROM, M. L. (eds) **Methods Carbohydr. Chem.**, New York: Academic Press, 1963, v.2, p.65-68.

WORANOVICZ-BARREIRA, S. M. **Estudo comparativo de polissacarídeos e oligossacarídeos de liquens do gênero *Cladonia***. Tese de Doutorado, Dep. Bioquímica, UFPR, 170 p. 1999c.

WORANOVICZ-BARREIRA, S. M.; GORIN, P. J. A.; ATHI, T., SASSAKI, G. L.; TISCHER, C. A.; IACOMINI, M. Chemotyping studies on the glucans of lichens of the genus *Cladonia*. **Phytochem.**, v.52, p.1069-1074, 1999b.

WORANOVICZ-BARREIRA, S. M.; GORIN, P. J. A.; SASSAKI, P. L.; MARCELLI, M. P.; IACOMINI, M. Galactomannoglucans of lichenized fungi of *Cladonia Spp.*: significance as chemotypes. **FEMS microbiol. Lett.**, 181, 313-317, 1999a.

XAVIER FILHO, L.; LEITE, J. B. M.; LIMA, E. O. Atividade antimicrobiana de líquens antárticos. **Boletim da Sociedade Broteriana**, v. 63, p. 93-98, 1990.

YAHR R, VILGALYS R, DEPRIEST PT. Strong fungal specificity and selectivity for algal symbionts in Florida scrub *Cladonia* lichens. **Molecular Ecology**. 13(11).3367-78. 2004.

YAMAMOTO, Y., WATANABE, A., Fatty acid composition of lichens and their phyco- and mycobionts. **J. Gen. Appl. Microbiol.**, v. 20, p. 83-86, 1974.

YAMAMOTO, Y.; KINOSHITA, Y.; TAKAHAGI, T.; KROKEN, S.; KUROKAWA, T.; YOSHIMURA, I. Factors affecting discharge and germination of lichen ascospores. **J. Hattori Bot. Lab.**, v. 85, p. 267-278, 1998.

YAMAMOTO, Y.; MIZUGUCHI, R.; YAMADA, Y. Tissue cultures of *Usnea rubescens* and *Ramalina yasudae* and production of usnic acid in their cultures. **Agric. Biol. Chem.**, v. 49, p. 3347-3348, 1985.

YOSHIMURA, I.; KUROKAWA, T.; KINOSHITA, Y.; YAMAMOTO, Y.; MIYAWAKI, H. Lichen substances in cultured lichens. **Journal of the Hattori Botanical Laboratory**, v. 76, p. 249-261, 1994.

Fatty acid composition of the tropical lichen *Teloschistes flavicans* and its cultivated symbionts

Rodrigo Arantes Reis ^a, Marcello Iacomini ^a, Philip Albert James Gorin ^a,
Lauro Mera de Souza ^a, Martin Grube ^c, Lucimara Mach Cortes Cordeiro ^b,
Guilherme Lanzi Sassaki ^{a,*}

^a Departamento de Bioquímica Universidade Federal do Paraná CP 19 046 CEP 81 531-990 Curitiba PR, Brazil

^b Centro de Ciências Médicas e Farmacêuticas Universidade Estadual do Oeste do Paraná - UNIOESTE CEP 85819-110 Cascavel PR Brazil

^c Institute of Plant Sciences Karl-Franzens-University Graz Holteigasse 6 A-8010 Graz Austria

Received 4 February 2005, received in revised form 24 March 2005, accepted 14 April 2005

First published online 30 April 2005

Edited by G M Gadd

Abstract

Fatty acid components, in both the free and combined form of the intact tropical lichen *Teloschistes flavicans*, and its isolated photobiont and mycobiont, were analyzed by GC-MS of derived methyl esters. Its rDNA analysis confirmed that the isolated cultured symbionts belong to the genera *Trebouxia* and *Teloschistes*, respectively. The fatty acid composition of the lichen did not correspond to those found in the isolated symbionts, suggesting that the fatty acid metabolism is markedly influenced by the symbiosis. Differences in the fatty acid composition in the lichen were observed during the summer (27 °C), when the main fatty acids were saturated and in the winter (22 °C) when an increase of unsaturated fatty acids occurred. Similar differences of composition were also observed for the cultured mycobiont at different temperatures. The increase in the unsaturation level at low temperatures would maintain the membrane fluidity. Our results are the first on the fatty acids of a tropical lichen and suggest that it is sensitive to small temperature variations, which influences its saturated and unsaturated fatty acid composition.

© 2005 Federation of European Microbiological Societies. Published by Elsevier B.V. All rights reserved.

Keywords: Lichen, Fatty acids, *Teloschistes flavicans*, Mycobiont, Photobiont, GC-MS

1 Introduction

Lichens have a symbiotic association between two or more organisms, namely a fungus (mycobiont) and one or more alga and/or cyanobacteria (photobiont). The thallus of the lichen has morphological characteristics that distinguish it from each symbiont in its isolated state [1]. Many studies have focused on component polysaccharides, secondary metabolites and fatty acids

of isolated bionts [2–4]. These have shown the ability of the mycobiont to produce some of the compounds found in the intact lichen, such as polysaccharides [4] and secondary metabolites [2].

Recently, studies carried out on the lichen *Physconia distorta* and its isolated mycobiont, have suggested an intimate relationship between the synthesis of secondary metabolites and its fatty acid metabolism, and showed that the mycobiont, cultured in a glucose-enriched media, high amounts of NAD(P)H were needed, so that the formation of fatty acid synthase was favored [5]. In the intact lichen, high amounts

* Corresponding author. Tel. +55 41 3611655, fax +55 41 2662042.
E-mail address: sassaki@ufpr.br (G.L. Sassaki).

are unnecessary so that secondary metabolites synthesis is predominant. Differences in culture conditions have also been used to explain structural variations in components of the photobiont, mycobiont, and isolated fungus [3,6,7].

A key factor in fatty acid metabolism is the temperature. It has been demonstrated in lichens, that the degree of unsaturation varies with the season, and decreases with increase of temperature [8,9], a phenomenon that also occurs in plants [10,11]. As far as we know, all the data in the literature concern lichens of temperate regions, where the amplitude of seasonal temperature variation is high [8,9]. Pierivittori et al. [12,13] found a different behavior in *Xanthoria parietina* growing at high elevations, an increase of unsaturated fatty acid contents occurring at a higher temperature and humidity.

We now compare the composition of total fatty acids, namely in the free and combined form, present in the thallus and apothecia of the lichen *Teloschistes flavicans*, growing in a tropical habitat as well as those present in its cultured mycobionts and photobionts.

2 Materials and methods

2.1 Collection and manipulation of lichen material

The lichen *T. flavicans* was collected from stunted trees growing in a “restinga” environment (sand banks, close to the sea, virtually at sea level) at 25° 32'05" S/48° 20' 30" W, on the Ilha do Mel, Pontal do Paraná, State of Paraná, Brazil. Collection was carried out during February (summer) and August (winter) of 2003. The average temperatures of the collection site were obtained from http://www.iapar.br/Sma/Cartas_Climaticas/Temperatura.htm.

As a first step in the comparative analysis of fatty acids present in different parts of the lichen thallus, they were manually dissected. The selected parts were: intact lichen (IL), apothecia (A), lichen without apothecia (LWA), as well as the isolated mycobiont (MY) and photobiont grown in two media, namely a *Trebouxia* medium (P TM) and Bold's basal medium (P BBM).

2.2 Mycobiont isolation and culture conditions

Mycobiont cultures were grown starting from multispore germination, according to Stocker-Worgotter, [14]. The apothecia were accordingly selected from the fresh thallus and fixed in the cover of a Petri dish using solid sterile vaseline. After two days, the spores were discharged into the BBM medium [1], the cover then replaced with a clean one, and the plate left for the spores to germinate. This started after two weeks, at which time they were transferred to tubes containing the LBM or MY medium [1].

After three months, small colonies were observed. These were then transferred to plates containing the LBM medium and left to grow with a 12 h light/12 h dark periodicity at temperatures of 22 and 27 °C. After 3 months, colony samples were collected, freeze dried and the fatty acid analyses performed.

2.3 Photobiont isolation and culture conditions

Photobiont cultures were obtained from thallus fragments of *T. flavicans*, following the method of Yamamoto [15], and inoculated into tubes containing the TM (*Trebouxia*)-agar medium [1].

After three weeks, the tubes containing contaminating microorganisms, such as fungi, yeast or bacteria, were discarded. In others, the pure lichen photobiont appeared from small segments after ~6–8 weeks, and growing contamination-free algae were transferred to slants or Petri dishes containing inorganic 2% agar-BBM [1]. For morphological evaluation, the photobionts were transferred to the inorganic BBM, cultivated for 4 weeks, and kept in a culture chamber at 24 °C with an alternating daily light/dark cycle of 12/12 h. Their morphological characters and life cycle were evaluated by light microscopy.

In order to obtain material for fatty acid analyses, culture was carried out for during 30 days under the above conditions in BBM and TM. The products were then centrifuged at 10 000 rpm for 5 min and the cell pellet washed 3 times with water and then freeze-dried.

2.4 DNA extraction, PCR and sequencing

Total DNA was extracted according to a modified CTAB method [16]. DNA-extracts were used for PCR-amplification of the ITS regions, including the 5.8S gene of nuclear rDNA. The algal-specific ITS primers ITS1T and ITS4T [17] were used for amplification of the rDNA from lichens with *Trebouxia* photobionts and the cultures of the photobionts of *T. flavicans*, while the primers ITS1R and ITS 4 [18] were used to amplify the rDNA from the lichen and its mycobiont.

Amplifications were performed in 30 µL reactions (7.05 µL H₂O, 3 µL dNTPs [1 mM], 1.5 µL of each primer [10 pM], 0.15 µL *Taq* DNA-polymerase, 12 µL DNA extract and 1.8 µL MgCl₂). Amplification conditions for 35 cycles were: denaturation at 95 °C for 1 min, annealing at 56 °C for 1 min, and elongation at 72 °C for 90 s for the primer pair ITS1T/ITS4T. The annealing temperature was decreased to 52 °C for the primer pair ITS1R/ITS4. PCR products were cleaned using QIAGEN quick spin columns (Qiagen) and quantified on a 1% agarose gel stained with ethidium bromide. Both complementary strands were sequenced using the primers ITS1T, ITS4T [17], ITS 2 and ITS 3 [18]. Sequencing was performed using a Dye Terminator

Cycle Sequencing Ready Reaction Kit (APPLERA, Vienna), according to the manufacturer's instructions, with detection using an ABI310 APPLERA automated sequencer. Sequences were assembled into full-length sequences using an Autoassembler. The ITS rDNA sequences now obtained were compared with available *Trebouxia* and *Teloschistes*-ITS sequences from GenBank.

2.5. Fatty acid extraction and analysis

Free and combined fatty acids were extracted together and analyzed by GC-MS according to Sassaki et al. [19]. Each product (30 mg) was extracted with a CHCl_3 -MeOH mixture (2:1 v/v; 9 mL) at 80 °C for 2 h, this procedure being repeated 3 times. For analysis of fatty acid composition, the extract (10 mg) was methanolized by refluxing in 3% HCl in MeOH for 2 h [19]. The resulting fatty acid methyl esters (FAMES) were extracted from MeOH with *n*-hexane and were analyzed by GC-MS using a Varian model 3800 gas chromatograph linked to a Varian ion trap, model 2000R mass spectrometer. FAME mixtures were analyzed using their R_f values and EI-MS profiles, and compared with those of standards (Sigma products for lipids). GC was performed using a DB-225 capillary

column (30 m \times 0.25 mm i.d.), programmed from 50 to 180 °C and 200 °C (40 °C min^{-1}), then hold. The carrier gas was He with a flow rate of 2 mL min^{-1} .

3. Results and discussion

3.1. Isolation and culture of symbionts

The mycobiont of *T. flavicans* (Fig. 1(a)) was isolated using the multispore germination technique. After fixing in the cover of a Petri dish, the ascospores of *T. flavicans* were discharged in packages of eight spores. After three days, the spores started to germinate, and after two weeks it was possible to recognize well developed hyphae (Fig. 1(b)). The colonies were then transferred to plates containing LBM and left for three months (Fig. 1(c)). ITS rDNA analysis of the isolated mycobiont confirmed that it belonged to *T. flavicans* (data not shown).

Photobionts of *T. flavicans* were present as light green colonies on the surface of TM-agar. When transferred to inorganic Bolds basal medium (BBM) [1] and cultivated for 4 weeks, the mature vegetative cells of the photobiont, *Trebouxia* sp. of *T. flavicans*, were spherical (Fig. 1c), 8–12 μm in diameter, uninucleate, with a nucleus located in the invagination of the chloroplast. This

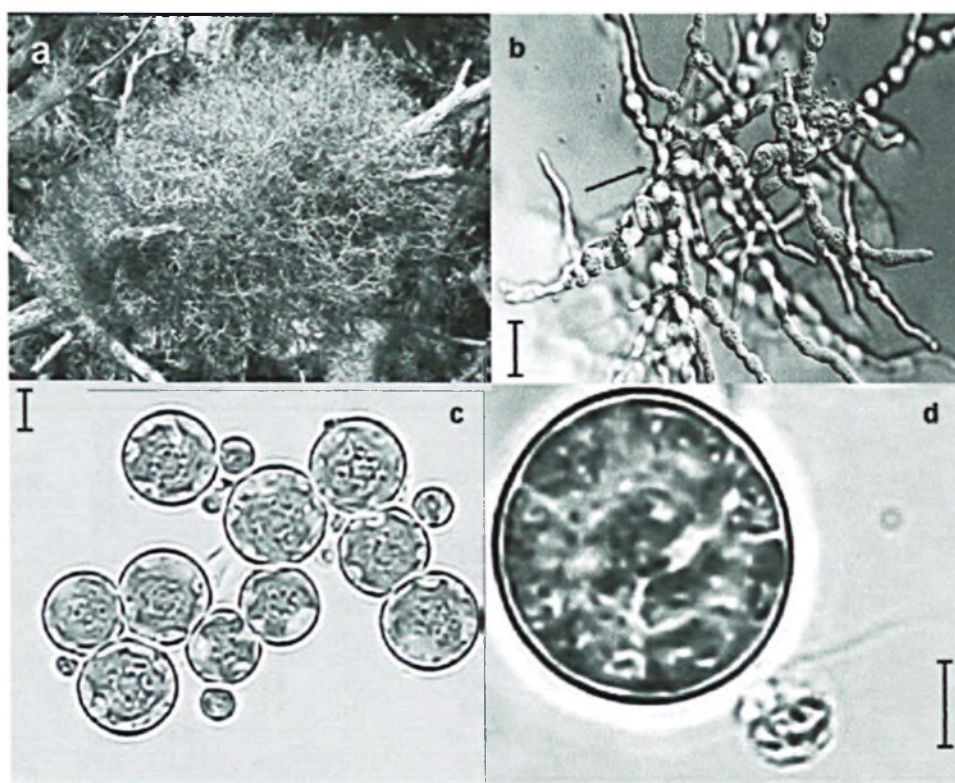


Fig. 1. *Teloschistes flavicans* (a); initial stages of mycelia development after two weeks of spore germination, arrow indicating the spore (b); Isolated *Trebouxia* sp. photobiont of *T. flavicans* showing vegetative cells (c); Austrosporangia and zoospore (arrow) of *Trebouxia* sp. (e). Bar: 5 μm .

was axial, with short lobes, and contained one pyrenoid distinct from a discontinuous starch sheath in the central portion. Asexual reproduction by autospores, zoo- and aplanospores was observed (*sensu* Tschermak-Woess [20]). The zoosporangia contained several flagellated zoospores, which were released by rupture of the mother cell wall (Fig. 1(d)).

The ITS rDNA of the isolated algae indicated that it belonged to the genus *Trebouxia*, being closely related with the UTEX strains *Trebouxia galapagensis* (UTEX 2230) and *Trebouxia higginsiae* (UTEX 2232). These strains are in agreement with other authors, who placed them in Clade IV of the *Trebouxia* phylogeny [21,22].

3.2 Fatty acid composition

The fatty acids produced by the cultured green algal photobiont *Trebouxia* sp., the lichen mycobiont, and intact *T. flavicans* were analysed by GC-MS of derived FAMES. The photobiont was grown in TM and BBM, which differ in their organic component. For the mycobiont, the culture was grown for three months at 22 and at 27 °C. To detect a possible seasonal variability in the fatty acid composition, the lichen was sampled during the winter (August) and summer (February). The complete GC-MS profile of fatty acid FAMES is shown in Table 1.

The yield of the chloroform-methanol extract did not vary significantly according to the season with intact *T. flavicans* and its isolated mycobiont. The apothecia, however, gave a yield of almost twice those of the others, probably due to the high amount of other secondary metabolites present.

The major fatty acids present in the thallus of *T. flavicans* were found to change with the season and its temperature (Table 1). The saturated fatty acids, palmitic and stearic, were the most abundant in February, at the height of summer, when the average temperature was about 23 °C. However, in the winter month of August, with an average temperature of about 18 °C, there was an increase in the unsaturated fatty acids, oleic and linoleic. No seasonal variation in composition occurred in the apothecia of the lichen.

Studies have been carried out on temperature-induced changes in the fatty acid composition of lichens. However, all the studies were conducted on lichens in regions with more pronounced differences in summer and winter temperatures. Dembitsky et al. [8] for example, observed a decrease in the unsaturated fatty acids of *Xanthoria parietina*, when it underwent a temperature change from –7 to 23 °C in only three months. We now show that in a tropical environment, even with variations of only 5 °C in two well-delimited seasons, the increase of fatty acid unsaturation level is related with the temperature decrease. It has already been suggested that in plants, a change in lipid metabolism is an adaptation to low temperatures, when an increase in the unsaturation level results in an increase in membrane fluidity [8–11].

When the mycobiont was grown at different temperatures the same response occurred. Unsaturated fatty acids comprised 52% of total fatty acids with growth at 22 °C, whereas at 27 °C this decreased to 28%. It was not possible to observe any such variations in the cultured *Trebouxia* sp. photobiont, as it did not grow at 27 °C.

Table 1

Fatty acid methyl esters (FAMES) of the mycobiont, photobiont and thallus of *Teloschistes flavicans*

FAME	R_t	27 °C ^a	23 °C ^a	BBM	TM	February	August	February	August	February	August
		MY	MY	PBBM	PTM	IL	IL	LWA	LWA	LA	LA
		18.5%	15.8%	16.5%	22.7%	19.4%	19.1%	17.6%	19.5%	27.0%	35.4%
C _{14:0} (myristic acid)	6.7	1.6	–	–	2.2	3.0	–	2.9	–	0.8	2.2
C _{15:0} (pentadecanoic acid)	7.4	tr	–	–	1.0	1.1	1.0	tr	0.7	0.4	0.3
C _{15:1} (pentadecenoic acid)	7.9	0.4	–	–	0.3	–	–	–	1.9	–	–
C _{16:0} (palmitic acid)	8.3	35.0	21.9	36.4	56.1	56.4	36.4	56.1	2.8	46.7	36.2
C _{16:1} (palmitoleic acid)	8.5	–	–	–	–	–	0.7	–	4.0	1.1	–
C _{17:0} (heptadecanoic acid)	9.2	–	–	–	1.2	1.2	–	1.1	3.9	2.0	–
C _{18:0} (stearic acid)	10.3	24.5	19.2	63.1	27.8	27.6	2.4	29.3	4.0	42.6	11.3
C _{18:1} (oleic acid)	10.7	13.7	48.6	tr	–	–	12.5	–	12.5	–	19.0
C _{18:2} (linoleic acid)	11.3	10.1	4.0	–	–	–	39.3	–	44.0	2.7	27.7
C _{18:2} (linoleic acid)	12.4	2.8	–	–	–	–	7.3	–	6.9	0.8	–
C _{20:0} (arachidic acid)	12.8	2.4	1.8	tr	3.4	3.0	–	3.8	–	1.0	3.0
C _{22:0} (behenic acid)	15.4	3.4	1.6	tr	3.4	3.4	–	3.3	–	0.3	–
C _{24:0} (lignoceric acid)	18.5	4.3	2.9	–	tr	tr	–	tr	–	1.3	–
C _{24:1} (tetracosenoic acid)	19.5	1.2	–	–	4.1	3.9	–	3.1	–	–	–

MY: mycobiont, PBBM: photobiont grown in BBM, PTM: photobiont grown in TM, IL: intact lichen, LWA: lichen without apothecia, LA: lichen apothecia, R_t : retention time in minutes.

^a Culture temperature of *T. flavicans* mycobiont.

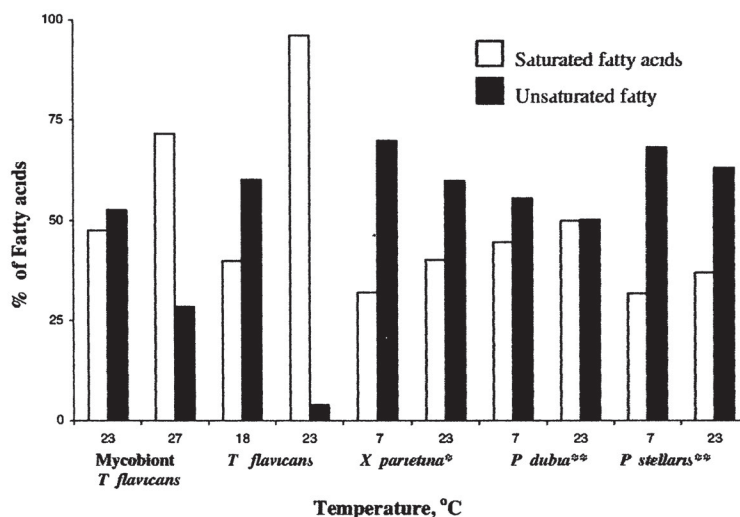


Fig. 2 Fatty acid variation of *Teloschistes flavicans*, its mycobiont, *Xanthoria parietina*, *Physcia stellaris*, and *Physcia dubia*. The abscissa indicates the environmental temperature of the collection region. * data obtained from Dembitsky et al. [8] ** data obtained from Dembitsky et al. [9]

On comparison of the fatty acid contents of tropical and temperate lichens, using a seasonal parameter (Fig. 2), it is evident that in the tropical samples, even the small variation of temperature has a great effect on fatty acid metabolism. Varying the temperature by 5 °C the saturated fatty acids of *T. flavicans* increased from 40% to 95%. In contrast with *Xanthoria parietina*, a lichen growing in temperate zones from the same family Teloschistaceae, a rise of 30 °C increased the contents of saturated fatty acids from 32% to 40% [8].

The photobiont gave a higher yield of lipids, when grown in TM, which is composed of glucose and peptone as organic sources of carbon and nitrogen respectively. This result might be expected, since there was an energy source resulting in a considerable production of energy reserve compounds, such as stearic and palmitic fatty acids when TM and BBM were used. Relatively low amounts of other saturated and unsaturated fatty acids were found when the photobiont was cultured in TM (Table 1).

In order to investigate a part of the thallus containing a higher proportion of fungal tissue, we compared the fatty acid composition of the apothecia with that of the thallus. However, no significant difference was found and this can be explained by the morphology of the *T. flavicans* apothecia, which is lecanoric, so that the algal layer is also present in the apothecia tissue. Some differences would be better visualized if lichens with apothecia without algal layer were studied.

The data show that even in tropical environments, a very short variation in the temperature amplitude, such as 5 °C, promotes a difference in the unsaturation level of the fatty acids in *T. flavicans*. The increase of unsaturated fatty acids found in lower temperatures are necessary to maintain a similar level of membrane fluidity

under this environment. We also observe that the overall fatty acid composition of the isolated symbionts does not correspond with that of the intact lichen (Table 1), and that neither that of the mycobiont is related with that of the apothecia. This behavior reflects the differences between products grown in vitro and in vivo.

References

- [1] Ahmadjian, V. (1993) *The Lichen Symbiosis*. John Wiley & Sons, New York, 250 pp.
- [2] Cordeiro, L.M.C., Iacomini, M. and Stocker-Wörgötter, E. (2004) Culture studies and secondary compounds of six *Ramalina* species. *Mycol. Res.* 108 (5), 489–497.
- [3] Torres, A., Dor, I., Rotem, J., Srebniuk, M. and Dembitsky, V.M. (2003) Characterization of surface *n*-alkanes and fatty acids of the epiphytic lichen *Xanthoria parietina*, its photobiont a green alga *Trebouxia* sp. and its mycobiont, from the Jerusalem hills. *Eur. J. Biochem.* 270, 2120–2125.
- [4] Cordeiro, L.M.C., Stocker-Wörgötter, E., Gorin, P.A.J. and Iacomini, M. (2004) Elucidation of polysaccharide origin in *Ramalina peruviana* symbiosis. *FEMS Microbiol. Lett.* 238, 79–84.
- [5] Molina, M.C., Crespo, A., Vicente, C. and Elix, J.A. (2003) Differences in the composition of secondary metabolites and fatty acids extracted from axenically cultured mycobiont and lichenized thalli of *Physcia distorta*. *Plant Physiol. Biochem.* 41, 175–180.
- [6] Yamamoto, Y. and Watanabe, A. (1974) Fatty acid composition of lichens and their phyco- and mycobionts. *J. General Appl. Microbiol.* 20, 83–86.
- [7] Bychek-Gushchina, I.A. (1997) Study of biochemical aspects of lichen symbiosis. I. Lipids and fatty acids in cultured lichen symbionts. *Biochemistry (Moscow)* 62 (5), 490–494.
- [8] Dembitsky, V.M., Rezanka, T. and Bychek, I.A. (1994) Seasonal variability of lipids and fatty acids in the tree-growing lichen *Xanthoria parietina* L. *J. Exp. Bot.* 45 (272), 403–408.
- [9] Dembitsky, V.M., Rezanka, T. and Bychek, I.A. (1994) Seasonal variation of lipids and fatty acids from tree-growing lichens of the genus *Physcia*. *Phytochemistry* 36 (3), 601–608.

- [10] Wassef, M.K. (1977) Fungal lipids. *Adv. Lipid Res.* 15, 159–232.
- [11] Tulloch, A.P. (1990) Glycosides of hydroxy fatty acids. In: *Handbook of Lipids Research* (Kates, M., Ed.), Glycolipids, Phosphoglycolipids and Sulphoglycolipids, vol. 6, pp. 463–487. Plenum Press, New York.
- [12] Piervittori, R., Alessio, F. and Maffei, M. (1994) Fatty acid variations in the lichen, *Xanthoria parietina*. *Phytochemistry* 36 (4), 853–856.
- [13] Piervittori, R., Alessio, F., Usai, L. and Maffei, M. (1995) Seasonal variations in lipids of *Xanthoria parietina* growing at high elevations. *Phytochemistry* 40 (3), 717–723.
- [14] Stocker-Worgotter, E. (1998) Culture methods and culture of selected tropical mycobionts and photobionts as exemplified by South American lichens. In: *Lichenology in Latin America: History, Current Knowledge and Applications* (Marcelli, M.P., Seaward, M.R.D., Eds.), pp. 143–154. CETESB Companhia de Tecnologia de Saneamento Ambiental – Estado de São Paulo, São Paulo, Brazil.
- [15] Yamamoto, Y., Mizuguchi, R. and Yamada, Y. (1985) Tissue cultures of *Usnea rubescens* and *Ramalina yasudae* and production of usnic acid in their cultures. *Agri. Biol. Chem. (Japan)* 49, 3347–3348.
- [16] Cubero, O.F., Crespo, A., Fatehi, J. and Bridge, P.D. (1999) DNA extraction and PCR amplification method suitable for fresh, herbarium-stored, lichenized, and other fungi. *Plant Syst. Evol.* 216 (3–4), 243–249.
- [17] Kroken, S. and Taylor, J.W. (2000) Phylogenetic species, reproductive mode, and specificity of the green alga *Trebouxia* forming lichens with the fungal genus *Letharia*. *The Bryologist* 103 (4), 645–660.
- [18] White, T.J., Bruns, T.D., Lee, S. and Taylor, J. (1990) Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal DNA genes for phylogenies. In: *PCR Protocols: A Guide to Methods and Applications* (Innis, M.A., Gelfand, D.H., Sninsky, J.J. and White, T.J., Eds.), pp. 315–322. Academic Press, San Diego.
- [19] Sasaki, G.L., Cruz, L.M., Gorn, P.A.J. and Iacomini, M. (2001) Fatty acid composition of lipids present in selected lichenized fungi: a chemotyping study. *Lipids* 36 (2), 167–174.
- [20] Tschermak-Woess, E. (1989) Developmental studies in trebouxoid algae and taxonomical consequences. *Plant Syst. Evol.* 164, 161–195.
- [21] Friedl, T., Besendahl, A., Pfeiffer, P. and Bhattacharya, D. (2000) The distribution of Group I introns in lichen algae suggests that lichenization facilitates intron lateral transfer. *Mol. Phylog. Evol.* 14, 342–352.
- [22] Helms, G., Friedl, T., Rambold, G. and Mayrhofer, H. (2001) Identification of photobionts from the lichen family *Physciaceae* using algal-specific ITS rDNA sequencing. *Lichenologist* 33, 73–86.



Molecular studies of photobionts of selected lichens from the coastal vegetation of Brazil

Lucimara M C Cordeiro ^a, Rodrigo A Reis ^b, Leonardo M Cruz ^b,
Elfriede Stocker-Worgotter ^c, Martin Grube ^d, Marcello Iacomini ^{b,*}

^a Centro de Ciencias Médicas e Farmacêuticas Universidade Estadual do Oeste do Paraná – UNIOESTE CEP 85819-110 Cascavel PR, Brazil

^b Departamento de Bioquímica Universidade Federal do Paraná, CP 19 046 CEP 81 531-990 Curitiba PR, Brazil

^c Institute of Plant Physiology University of Salzburg Hellbrunner Strasse 34 A-5020 Salzburg Austria

^d Institute of Plant Sciences Karl Franzens-University Graz Holteigasse 6, A-8010 Graz Austria

Received 14 November 2004, received in revised form 16 February 2005, accepted 4 May 2005

Abstract

A light microscopic and molecular analysis of photobionts in *Ramalina* and *Cladonia* from coastal habitats of Brazil is presented. A Bayesian phylogenetic analysis of ITS rDNA sequences suggests a *Trebouxia* lineage which is preferentially tropical in geographic distribution. This highly diverse clade also includes the morphologically similar species *Trebouxia higginsiae* and *galapagensis*. Within the predominantly tropical clade of *Trebouxia* we distinguish several subclades, three of which are represented in our samples of *Ramalina* species. Since sexuality has not been recognized in coccal lichenised photobionts until recently, we cannot apply a biological species concept, but when compared with the sequence diversity between known species we conclude that several new species need to be described in this clade. The mutually exclusive presence of other *Trebouxia* lineages in temperate samples of *Ramalina* suggests an evolution towards higher selectivity in this genus. A strictly tropical lineage is not conspicuous in the photobionts of the genus *Asterochloris* sampled from *Cladonia* so far.

© 2005 Published by Elsevier B.V. on behalf of the Federation of European Microbiological Societies

Keywords: Photobionts, Lichen, *Trebouxia*, *Asterochloris*, *Ramalina*, *Cladonia*; ITS rDNA

1 Introduction

Compared with the mycobiont partner of lichens, still little is known about the geographic distribution and ecology of the associated photobionts. Historically, this can be explained by the general difficulty to recognize the species in the lichen thallus. Previous identifications therefore included the isolation and axenic culture of algal symbionts. With the use of molecular tools, the interest in this symbiotic partner has increased. Friedl and

Rokitta [1] showed a clear heterogeneity of trebouxoid photobionts. Species with a chloroplast closely appressed to the cell wall at certain stages and an indistinct pyrenoid, containing regular thylakoids, were found to be distantly related to the core *Trebouxia* cluster. These data agree with the findings of Tschermak-Woess [2] who splitted *Trebouxia* in two subgenera *Trebouxia* and *Eleutherococcus*. Piercey-Normore and DePriest [3] compared the sequences of several photobionts of *Cladonia* spp., including the subgenus *Eleutherococcus* sensu Tschermak-Woess and the isolated photobionts from *Anzina carneonivea*, i.e. *Asterochloris phycobiontica* [4]. They found 93% of similarity on their ITS sequences, suggesting that all these photobionts belong

* Corresponding author. Tel. +55 41 3611655, fax +55 41 2662042.
E-mail address: iacomini@ufpr.br (M. Iacomini).

to the same genus *Asterochloris*. Phylogenetic studies of ITS rDNA from *Trebouxia* allowed the assignment of photobionts to certain clades [5,6] or focused on selectivity/specificity of fungi for photobionts [7]. These studies show that there are clear differences in photobiont selectivity in lichens. Only two species of *Trebouxia* were observed in some foliose Physciaceae by Dahlkild et al. [8], while in *Parmelia* and in the lichen genus *Umbilicaria* from Antarctica, several photobionts were found in different thalli of a single species [6,9]. There are few studies dealing with the diversity of photobionts of particular habitats. Beck et al. [5,10] indicated that a green algal species can generally be selected from a more diverse "pool of locally available algae". A similar situation has been found in lichens that are associated with cyanobacteria [11]. The "pool" or guild of photobionts comprise a number of species that are adapted to a certain habitat. It is not clear whether the composition of the "pool" is changing in different geographic regions and still little is known about the biogeography of photobionts. While the systematics of tropical lichens are now increasingly understood taxonomically and floristically, much less is still known about their photobionts. Practically nothing is known about cyanobacterial symbionts of tropical lichens, and the state of knowledge of the very common representatives of Trentepohliaceae in lichens is quite limited [12,13]. While morphological data of growth form could assist in the recognition of taxa in the latter group, this is hardly possible in the second large group of eukaryotic tropical lichen photobionts, the coccale green algae of the Chlorophyceae. Phenotypic characters of this group are best studied using cultivated isolates, while molecular sequence data can readily be used to assess their phylogenetic relationships. Photobionts of lichen from tropical regions are included in a clade (Clade IV) in Friedl et al. [14], which includes lichens from Galapagos Islands and Florida – USA [9]. Some tropical members of Physciaceae are also included in this clade [7].

The Brazilian coast is composed of diverse environments. Ecologically outstanding are the "restinga" (sand bank vegetation) and mangrove. Restinga is an assemblage of coastal sandy ecosystems with floristically and physiognomically distinct communities. These plant communities colonize sediments of diverse origin, forming an edaphic vegetational complex that occupies a narrow belt along the coast, including such distinct regions as beaches, dunes and associated depressions, sand ridges, terraces and plains [15]. Although, this environment in Brazil is rich in lichens, detailed information is available only for some few species such as *Ramalina* [16] and *Cladonia* [17–21]. Differently from the restinga, the mangrove represents tropical vegetation developed in areas which are periodically inundated from the tides and are particularly present in areas where riverine habitats border to the sea [22]. However, the lichen flora in

the mangrove does not seem to be much different from that in other tropical rain forest close to the coast [23].

In the present paper, we describe the phylogenetic position (ITS rDNA sequence comparison) and light microscopic characters of photobionts from some tropical lichens belonging to the families Ramalinaceae and Cladoniaceae, from different coastal environments of Brazil.

2 Material and methods

2.1 Lichen material

Samples utilized in this study were collected in different environments of Brazil. *Restinga Ramalina sprengelii* 68, *Ramalina gracilis* 63, *Ramalina peruviana* 67 – 25°32'05"S/48°20'30"W, sea level (0 m), Ilha do Mel, Pontal do Paraná – PR, Brazil (February/2004). *Ramalina sorediosa* 59, *Ramalina anceps* 70 – 25°19'52"S/48°25'10"W, 8 m, Ilha Rasa, Guaraquecaba – PR, Brazil (February/2004). *R. gracilis*, *Ramalina complanata* – 27°35'48"S/48°32'57"W, 3 m, Campeche Beach, Santa Catarina Island – SC, Brazil (August/2001). *Cladonia confusa* – 25°32'05"S/48°20'30"W, on sandy soil, sea level, Ilha do Mel, Pontal do Paraná – PR, Brazil (August/2001).

Mixed rain forest R. peruviana 58 – 25°26'15"S/49°03'45"W, 940 m, Piraquara – PR, Brazil (February/2004).

Mangrove Ramalina sorediosa 60 – 25°19'51"S/48°27'40"W, sea level, Guaraquecaba – PR, Brazil (February/2004). *R. anceps* 78 (6) 25°19'31"S/48°25'49"W, sea level, Guaraquecaba – PR, Brazil (February/2004). *Ramalina dendroides* 79 (8) 25°19'04"S/48°26'41"W, sea level, Guaraquecaba – PR, Brazil (February/2004).

Recovery area of Atlantic rain forest R. peruviana 81 (5) 25°14'36"S/48°29'38"W, 40 m, Guaraquecaba – PR, Brazil (February/2004).

Caatinga Cladonia verticillaris – 7°26'S/34°56'W, Alhandra – PB, Brazil.

Atlantic rain forest – Savanna (contact zone) Cladonia crinita, *Cladonia fissidens* – 20°05'S/43°29'W, Sandy Soil, Monasterio do Caraça – MG, Brazil.

Some samples from non-tropical environments were included: *Cladonia perforata*, Eric Mendes Biological Station, Florida, USA (subtropical, gift from Rebecca Yahr). *Ramalina fraxinea* FB30 and *Ramalina farinacea* FB22 Slovenia, 1997.

All the voucher specimens are placed in the UPCB Herbarium (UFPR-Curitiba, Brazil).

2.2 DNA extraction, PCR and sequencing

Total DNA was extracted according to a modified CTAB method [24]. DNA-extracts were used for PCR-amplification of the ITS regions including the 5.8S gene

of the nuclear rDNA. The algal-specific ITS primers ITS1T and ITS4T [25] were used for amplification of the rDNA from lichens with *Trebouxia* photobionts and the cultures of the photobionts of *R. complanata* and *R. gracilis* while the primers ITS1R and ITS 4 [26] were used to amplify the rDNA from the lichens with “*Asterochloris*” photobionts and the culture of the photobiont of *Cladonia confusa*.

Amplifications were performed in 30 µL reactions (7.05 µL H₂O, 3 µL dNTPs [1 mM], 1.5 µL of each primer [10 pM], 2 units *Taq* DNA-polymerase, 12 µL DNA extract and 1.8 µL MgCl₂ [1.5 mM]). Amplification conditions were 35 cycles of a denaturation at 95 °C for 1 min, annealing at 56 °C for 1 min and elongation at 72 °C for 1 min 30 s for the primer pair ITS1T/ITS4T. The annealing temperature was decreased to 52 °C for the primer pair ITS1R/ITS4. PCR products were cleaned using QIAGEN quick spin columns (Qiagen) and quantified on 1% agarose gel stained with ethidium bromide. Both complementary strands were sequenced using the primers ITS1T, ITS4T [25], ITS 2 and ITS 3 [26]. The sequencing was performed using Dye Terminator Cycle Sequencing Ready Reaction Kit (APPLERA, Vienna) according to the manufacturer's instructions, with detection on an ABI 310 automated sequencer (APPLERA, Vienna). Sequences were assembled into full-length sequences using Autoassembler.

2.3 Data analysis

The ITS rDNA sequences obtained in this study were aligned with available *Trebouxia* and *Asterochloris*-ITS sequences from GenBank (Table 1) using Clustal W included in the BioEdit Sequence Alignment Editor [27]. The phylogenetic hypothesis for *Trebouxia* and *Asterochloris* species was constructed using a Bayesian approach as implemented in the program MrBayes [28]. The nucleotide substitution models (GTR + G *Trebouxia* Tree, K80 + G “*Asterochloris*” tree) were selected using a likelihood ratio test [29] with a program MrModelTest [30], a simplified version of ModelTest v3.06. For other parameters default settings were applied. The Markov Chain Monte Carlo (MCMC) analysis was run for 2,000,000 generations, with chains starting from a random tree, and using the default temperature of 0.2. The run was repeated 5 times to assess whether the chains converged to a stable phylogeny. For each run every hundredth tree was sampled, while the first 50,000 generations were discarded as burn-in. The trees from each run were joined in one file and a consensus phylogram was calculated with showing mean branch lengths using the *sumt* command in MrBayes. In addition, we assessed branch support by parsimony bootstrapping with 1000 replicate heuristic searches using PAUP*4.0b10 [31]. Phylogenetic trees were drawn using the program Treeview [32].

2.4 Photobiont isolation and culture conditions

Photobiont cultures were obtained from thallus fragments of the lichens *Ramalina gracilis*, *R. complanata* and *Cladonia confusa*, following the method of Yamamoto [33]. Preferably the green fragments containing the photobiont cells and remaining on the 150 µm filter, were picked up with a sterile needle under a dissecting microscope and transferred to slanted Sabouraud-2% sucrose-agar medium [34,35].

After three weeks, the tubes containing contaminant microorganisms, such as fungi, yeast or bacteria, were discarded. Cultured lichen photobiont appeared from the small segments after about 6–8 weeks and the growing algae free of contamination were transferred to slants or Petri dishes with inorganic Bolds Basal Medium (BBM) – 2% agar medium [36]. For morphological evaluation, the photobiont was cultivated for 4 weeks and kept in the culture chamber at 24 °C with an alternating daily cycle of 12/12 h. Its morphological characters and life cycle were observed using light microscopy.

3 Results

3.1 Molecular data

Photobiont ITS rDNA sequences from Ramalinaceae analysed together with available ITS sequences from GenBank showed four major ITS clades (Fig. 1) according to Friedl et al. [14]. Clade I is 100% supported and is represented by *T. gigantea* (UTEX2231), *T. showmanii* (UTEX2234), *T. incrustata* (UTEX784), *T. arboricola* (SAG 219-1a) and *T. arboricola* (92011C5). The two non-tropical *Ramalina* specimens used in this work (*R. farinacea* FB22, *R. fraxinea* FB30) are placed in this clade. Clade II (85% supported) containing *T. potterii* (UTEX900), *T. flava* (UTEX181) and *T. impressa* was used as outgroup. Clade III (supported 100%) is represented by *Trebouxia* specimens, that according Beck [37] and Helms [7] are closely related to *T. simplex* TW-1A2. All the tropical samples from *Ramalina* and their isolated photobionts were placed in Clade IV, together with *T. usneae*, *T. higginsiae*, *T. corticola* and *T. galapagensis*. This main clade was strongly supported in the phylogenetic tree, and, with exception of *T. corticola* and *T. usneae*, all the samples originated from tropical environments. These data agree with Helms [7], who found that some of the tropical samples of Physciaceae were placed together with *T. galapagensis*, in a clade that was denominated Clade G by him.

The Clade IV is divided in four well-supported monophyletic subclades (all with 100% support). The subclade presents two monophyletic lineages, the first (a1) contains the photobiont from *R. peruviana* 67 (from rest-

Table 1

Trebouxia and Asterochloris species used in this study

Lichen species	Photobiont ^b	GenBank ^a	References
<i>Anzina carneonivea</i>	<i>A. phycobiontica</i>	AF345374	[3]
<i>Cladia aggregata</i>	<i>Asterochloris</i> sp	AF345437	[3]
<i>Cladonia confusa</i>	<i>Asterochloris</i> sp (culture)	AY842279	This Study
<i>Cladonia bellidiflora</i>	<i>Asterochloris</i> sp	AF345413	[3]
<i>Cladonia chlorophaea</i>	<i>Asterochloris</i> sp	AF345431	[3]
<i>Cladonia crinita</i>	<i>Asterochloris</i> sp	AY842277	This Study
<i>Cladonia crispata</i>	<i>Asterochloris</i> sp	AF345378	[3]
<i>Cladonia cristatella</i>	<i>Asterochloris</i> sp	AF345425	[3]
<i>Cladonia didyma</i>	<i>Asterochloris</i> sp	AF345415	[3]
<i>Cladonia farinacea</i>	<i>Asterochloris</i> sp	AF345432	[3]
<i>Cladonia fimbriata</i>	<i>Asterochloris</i> sp	AF345434	[3]
<i>Cladonia fissidens</i>	<i>Asterochloris</i> sp	AY842278	This Study
<i>Cladonia furcata</i>	<i>Asterochloris</i> sp	AF345429	[3]
<i>Cladonia grayii</i>	<i>Asterochloris</i> sp	AF345376	[3]
<i>Cladonia grayii</i>	<i>Asterochloris</i> sp	AF345385	[3]
<i>Cladonia ochrochlora</i>	<i>Asterochloris</i> sp	AF345438	[3]
<i>Cladonia parasitica</i>	<i>Asterochloris</i> sp	AF345426	[3]
<i>Cladonia perforata</i>	<i>Asterochloris</i> sp	AY842280	This Study
<i>Cladonia pyxidata</i>	<i>Asterochloris</i> sp	AF345436	[3]
<i>Cladonia scabriuscula</i>	<i>Asterochloris</i> sp	AF345424	[3]
<i>Cladonia strepsilis</i>	<i>Asterochloris</i> sp	AF345401	[3]
<i>Cladonia subulata</i>	<i>Asterochloris</i> sp	AF345427	[3]
<i>Cladonia symphylicarpa</i>	<i>Asterochloris</i> sp	AF345430	[3]
<i>Cladonia turgida</i>	<i>Asterochloris</i> sp	AF345428	[3]
<i>Cladonia verticillaris</i>	<i>Asterochloris</i> sp	AY842276	This Study
<i>Cladonia rappii</i>	<i>Asterochloris</i> sp	AF345417	[3]
<i>Cladonia cristatella</i>	<i>T. erici</i> (UTEX912)	AF345441	[3]
<i>Cladonia</i> sp	<i>T. magna</i> (UTEX67)	AF345423	[3]
<i>Stereocaulon dactylophyllum</i>	<i>Asterochloris</i> sp	AF345442	[3]
<i>Stereocaulon dactylophyllum</i>	<i>T. excentrica</i> (UTEX1714)	AF345433	[3]
<i>Stereocaulon pileatum</i>	<i>T. glomerata</i> (UTEX897)	AF345405	[3]
<i>Stereocaulon pileatum</i>	<i>T. pyriformis</i> (UTEX1713)	AF345407	[3]
<i>Stereocaulon</i> sp	<i>T. irregularis</i> (UTEX2236)	AF345411	[3]
<i>Anaptychia runcinata</i>	<i>Trebouxia</i> sp	AJ293781	[38]
<i>Buellia georgei</i>	<i>Trebouxia</i> sp	AJ293783	[38]
<i>Buellia straminea</i>	<i>T. higginsiae</i> (UTEX 2232)	AJ249574	[14]
<i>Caloplaca cerina</i>	<i>T. gigantea</i> (UTEX2231)	AJ249577	[14]
<i>Diploschistes diacapsis</i>	<i>T. asymmetrica</i>	AJ249565	[14]
<i>Free-living</i>	<i>T. corticola</i> (UTEX 909)	AJ249566	[14]
<i>Hypogymnia physodes</i>	<i>T. simplex</i> Hp-MT1	AJ511357	[46]
<i>Lecanora dispersa</i>	<i>T. incrustata</i> (UTEX784)	AJ293795	[38]
<i>Lecanora hageni</i>	<i>T. showmannii</i> (UTEX2234)	AF242470	[25]
<i>Lecanora rubina</i>	<i>T. potteri</i> (UTEX900)	AF242469	[25]
<i>Letharia vulpina</i>	<i>T. simplex</i>	AF242457	[25]
<i>Melanelia glabra</i>	<i>T. impressa</i>	AJ249576	[14]
<i>Parmotrema tinctorum</i>	<i>Trebouxia</i> sp (UBT-87 019A1)	Z68702	[45]
<i>Physcia pulverulenta</i>	<i>T. flava</i> (UTEX181)	AF242467	[25]
<i>Pseudevernia furfuracea SK</i>	<i>T. simplex</i>	AF242459	[25]
<i>Punctelia subrudecta</i>	<i>T. arboricola</i>	AJ249564	[14]
<i>Ramalina anceps</i> (70)	<i>Trebouxia</i> sp	AY842269	This study
<i>Ramalina anceps</i> (78)	<i>Trebouxia</i> sp	AY842268	This study
<i>Ramalina complanata</i>	<i>Trebouxia</i> sp (culture)	AY842262	This study
<i>Ramalina dendroides</i> (79)	<i>Trebouxia</i> sp	AY842267	This study
<i>Ramalina farinacea</i> (FB22)	<i>Trebouxia</i> sp	AY842264	This study
<i>Ramalina fraxineae</i> (FB30)	<i>Trebouxia</i> sp	AY842265	This study
<i>Ramalina gracilis</i> (63)	<i>Trebouxia</i> sp	AY842273	This study
<i>Ramalina gracilis</i>	<i>Trebouxia</i> sp (culture)	AY842263	This study
<i>Ramalina peruviana</i> (58)	<i>Trebouxia</i> sp	AY842270	This study
<i>Ramalina peruviana</i> (67)	<i>Trebouxia</i> sp	AY842266	This study
<i>Ramalina peruviana</i> (81)	<i>Trebouxia</i> sp	AY842275	This study
<i>Ramalina solediosa</i> (59)	<i>Trebouxia</i> sp	AY842272	This study
<i>Ramalina solediosa</i> (60)	<i>Trebouxia</i> sp	AY842271	This study

(continued on next page)

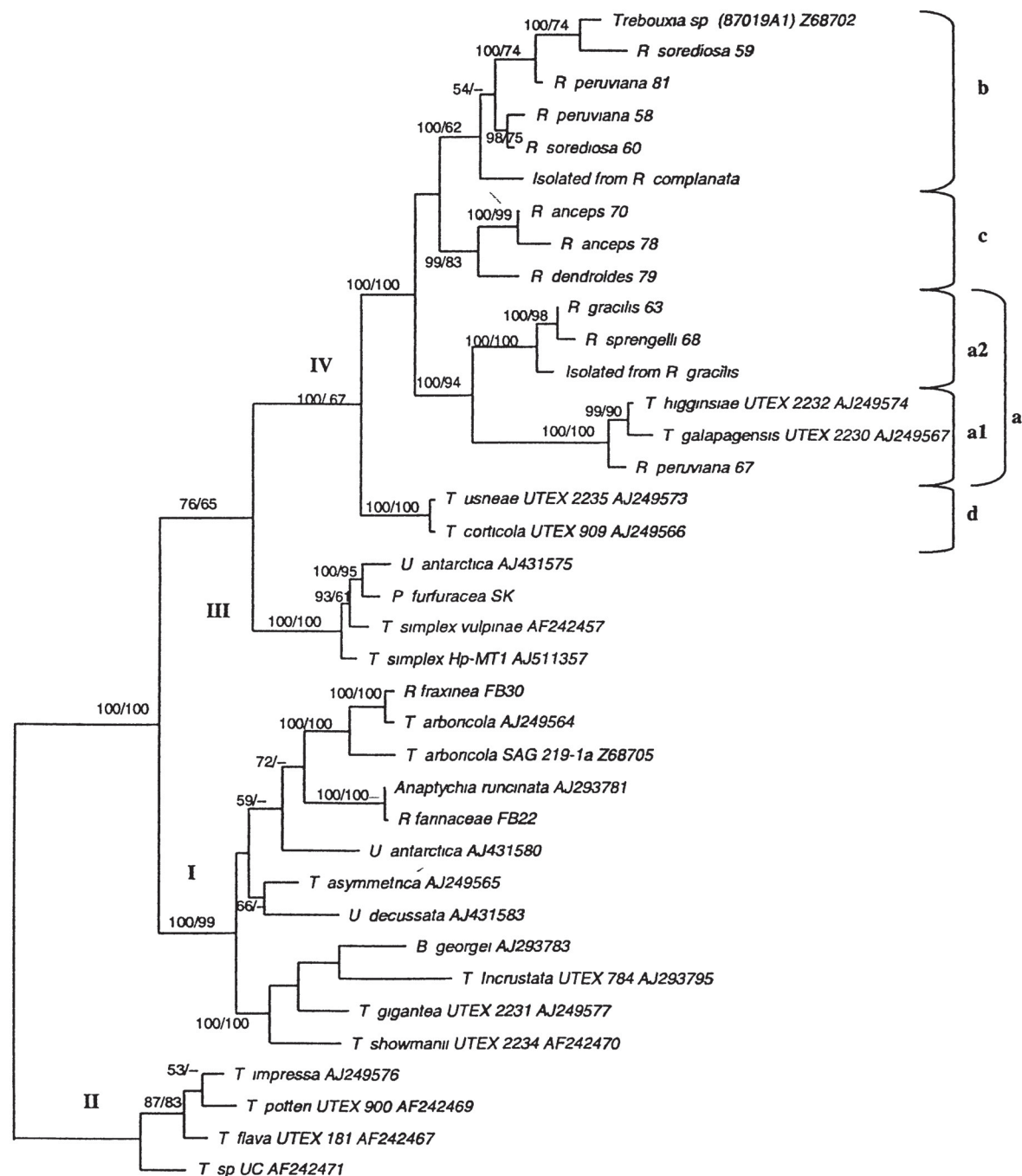
Table 1 (continued)

Lichen species	Photobiont ^b	GenBank ^a	References
<i>Ramalina</i> sp	<i>T. galapagensis</i> (UTEX2230)	AJ249567	[14]
<i>Ramalina sprengeli</i> (68)	<i>Trebouxia</i> sp	AY842274	This study
<i>Umbilicaria antarctica</i>	<i>Trebouxia</i> sp	AJ431580	[6]
<i>Umbilicaria decussata</i>	<i>Trebouxia</i> sp	AJ431583	[6]
<i>Umbilicaria antarctica</i>	<i>Trebouxia simplex</i>	AJ431575	[6]
Unknown	<i>T. arboricola</i> (SAG219-1a)	Z68705	[45]
<i>Usnea arizonica</i>	<i>Trebouxia</i> sp	AF242471	[25]
<i>Usnea filipendula</i>	<i>T. usneae</i> (UTEX2235)	AJ249573	[14]

^a Accession number for ITS rDNA sequence
^b Culture strain between brackets

inga) together with the isolated strains of *T. higginsiae* and *T. galapagensis*. According to Friedl et al. [14] the latter sequences are identical, although their GenBank sequences differ by a gap of 45 nucleotides in *T. higginsiae*. The close distance with these sequences strongly suggest that the photobiont of *R. peruviana* 67 belongs to the same species. The second (a2) is characterized exclusively by samples from restinga. One of the branches of clade a2 is represented by the isolated strain of *Ramalina gracilis*. Its life cycle and morphological characteristics are described below.
 The subclade (b) is well supported (100%), and includes the photobiont isolated from *Parmotrema tinctorum* (strain 87019A1) a typical sub-tropical lichen (collected in Florida-USA, Friedl [9]). This photobiont was first classified as *T. usneae* [9], however, recent publications refer to it as *Trebouxia* sp. [7,38]. Moreover this subclade contains the isolated photobiont of *R. complanata*, which is also described in detail below. More diversity of environments was found in the subclade (b), with samples from mangrove, restinga, Atlantic rain forests and from Florida.
 The subclade (c), present in clade IV comprises samples from mangrove and restinga, however, the restinga area where one of the samples (*R. anceps* 70) was collected on an island, “Ilha Rasa, Baía de Guaraqueçaba – PR (Brazil)”, which is surrounded by mangrove trees where the lichen *Ramalina anceps* is very common, and develops rather large thalli, sometimes exceeding 50 cm in length.
 Subclade (d) contains the UTEX isolated strains *T. usneae* and *T. corticola* (*Usnea filipendula* and free-living, respectively). This is the only subclade in clade IV without tropical samples. Both samples originated from the USA according to Ettl and Gartner [39].
 Besides the high supporting values found for all the subclades, their interrelationships are not well resolved. Because the ITS sequences from *Asterochloris* are hardly alignable to those of *Trebouxia* sensu strictu, they were analysed separately, but together with other *Asterochloris* sequences from Genbank. We found a tree with the same structure that was also obtained by Piercey-Normore and DePriest [3] with three main clades (Fig. 2), and

clade III, which included the isolated strain UTEX 912 from *Trebouxia erici*, was used as an outgroup [3,40].
 Similar to Piercey-Normore and DePriest [3], clade I is very well supported (100%) but not well resolved. It comprises the isolated strains of “*Trebouxia*” *glomerata* (UTEX 897), “*Trebouxia*” *pyriformis* (UTEX 1713), “*Trebouxia*” *irregularis* (UTEX2236) and the isolated photobiont from *Anzina carneonivea*, *Asterochloris phylobiontica* [4].
 Although the clade II itself is not well supported (69%), we may distinguish three more or less distinct subclades. The subclades a and c are highly supported (97% and 100%, respectively), but do not include any of the isolated UTEX strain. The subclade (b) is not well supported (74%), and contains the isolated strain of “*Trebouxia*” *magna* (UTEX 67), and also the isolated photobionts from the subtropical lichen *C. perforata*.
 All the sequences sampled from tropical lichens are placed in the subclade (c). Our samples from the South (*C. confusa*) and Northeast (*C. verticillaris*, *C. crinita* and *C. fissidens*) of Brazil are placed together with the Guyana samples related by Piercey-Normore and DePriest [3] (data not shown). This subclade is not strictly tropical, as also *Cladonia rappi* and *Cladonia didyma* from the USA are included [3]. However, these widespread species are present from the south of Brazil up to the southeast of USA [18–41].
 3.2 Morphological data
 Photobionts of *R. gracilis*, *R. complanata* and *C. confusa*, isolated from thallus fragments, produced axenic dark-green, rough colonies on the surface of Sabouraud-2% sucrose-agar (Fig. 3(a)). When transferred to inorganic Bolds Basal Medium (BBM) and cultivated for 4 weeks, mature vegetative cells of *Trebouxia* sp. from *Ramalina* species are spherical (Figs. 3(b) and 4(a)), 8–12 µm in diameter, uninucleate, with the nucleus located in the invagination of the chloroplast, nucleolus sometimes visible. The chloroplast is axial, with short lobes, and contained one pyrenoid that is distinct by a continuous starch sheath (discontinuous in *Ramalina complanata*



10

Fig. 1 *Trebouxia* phylogeny based on the ITS rDNA sequences. Branch support is shown as posterior probability (Bayesian analysis) followed by parsimony bootstrap values. Missing support and dashes indicate that the branch was not resolved.

isolated) in the central portion. Asexual reproduction by autospores, zoo- and aplanospores was observed (*sensu* Tschermak-Woess [2]). The mother cells gave rise to 4, 8 or 16 autospores (Figs 3(c) and 4(b)). Within these autospores the sporangial wall is visible and a tiny, triangular interspace between two neighbouring cells and the sporangial wall persists (Fig 3(c), arrow). Different stages of protoplast division were seen, in which the origi-

nal protoplast had divided into a few to numerous new protoplasts (Fig 3(d) and (e)). The transformation of trophic cells into zoo-/aplanosporangia started with the formation of a local thickening of the cell wall that marks the prospective opening (Figs 3(f) and 4(c)). The zoosporangia (Fig 3(g)) contained 64 or 128 zoospores, which were released by rupture of the mother cell wall. When their release was arrested, the zoosporangia developed into apl-

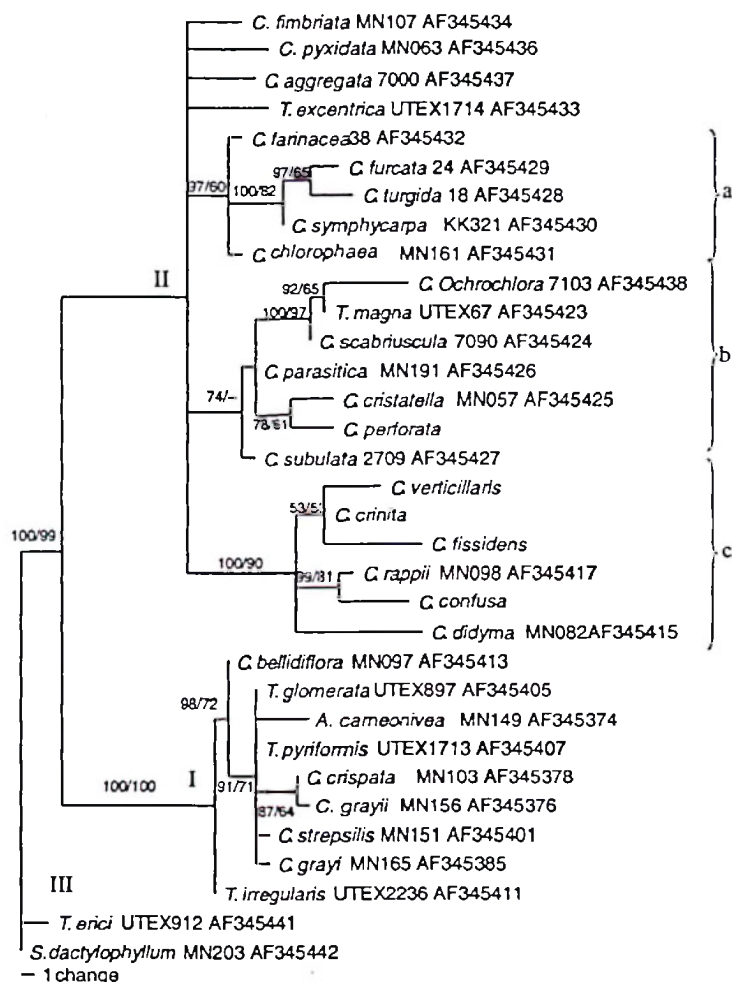


Fig. 2. *Asterochloris* phylogeny based on the ITS rDNA sequences. Branch support is shown as posterior probability (Bayesian analysis) followed by parsimony bootstrap values. Missing support and dashes indicate that the branch was not resolved.

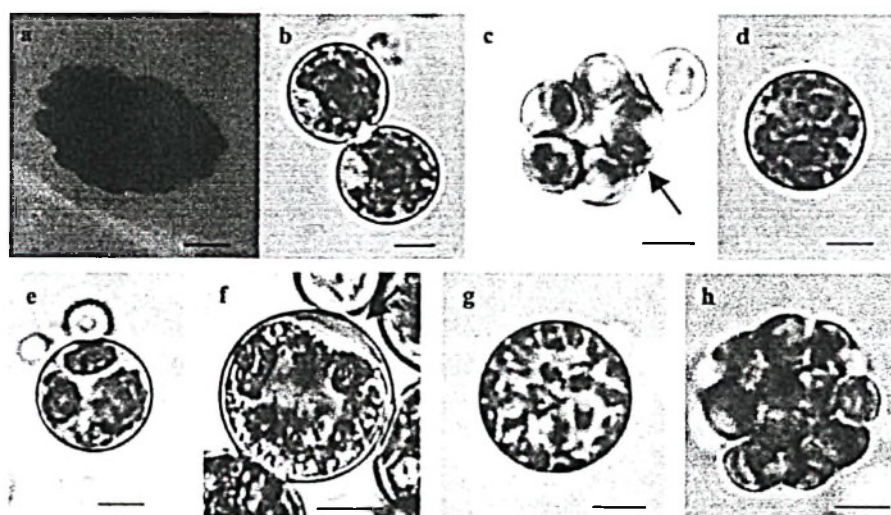


Fig. 3. Photobiont *Trebouxia* sp. isolated from *Ramalina gracilis*. (a) Axenic dark-green colony grown on solid Sabouraud-2% sucrose-agar after 4 months of incubation. Bar, 1 mm. (b) mature vegetative cells showing pyrenoid and structure of chloroplast; (c) autosporangia with 8 daughter cells; (d, e) successive divisions of the protoplast; (f) developing zoosporangium with bulging thickening of cell wall (arrow); (g) fully developed zoosporangium; (h) aplanosporangia. Bars, 5 µm.

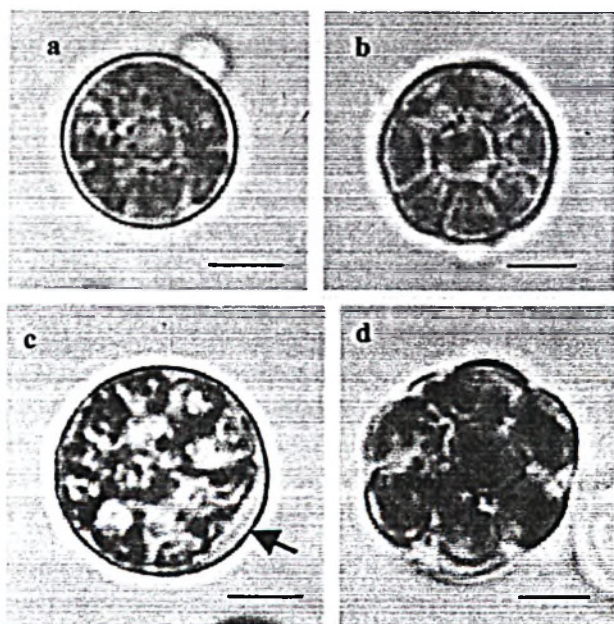


Fig. 4. Photobiont *Trebouxia* sp. isolated from *Ramalina complanata*. (a) mature vegetative cell showing central pyrenoid and lobation of chloroplast; (b) autosporangium with 16 daughter cells; (c) mature zoosporangium with thickening of cell wall (arrow); (d) aplanosporangium. Bars, 5 µm.

357 anosporangia (Fig. 3(h) and 4(d)), the zoospores ab-
358 sorbed their flagella, rounded up and produced their
359 own cell wall.

360 On the other hand, in the log growth phase, mature
361 vegetative cells of the photobiont *Asterochloris* sp. of
362 *Cladina confusa* are slightly ellipsoidal or spherical
363 (Fig. 5(a) and (b)) and asexual reproduction only occurs

by zoo- (Fig. 5(d)) and aplanospores (Fig. 5(g)). Autos-
pore production is absent. The thickening of the mother
cell wall was also observed (Fig. 5(c)), before the zoo-
sporangia finally opened and released the zoospores.
These were naked, 3–5 µm in width, 5–7 µm in length,
had two whip-like flagella and a chloroplast in posterior
position (Fig. 5(e)). After the zoospores were released,
also a few cells remained within the sporangium and
developed into young vegetative cells within the old spo-
rangial wall (Fig. 5(f)). Moreover, many empty cell walls
were adhering together, forming large packages.

4. Discussion

The molecular data from two genera of lichens from
coastal vegetation of Brazil indicate that poorly investi-
gated lineages of lichen photobionts are predominant in
tropical environments. Helms [7] analysed a larger num-
ber of Physciaceae, and all tropical samples are distrib-
uted in one clade (G), related to *Trebouxia galapagensis*
or *T. higginsiae*. This clade is here subdivided in several
distinct lineages, which might represent new species.
These merit a valid description at a later stage, when
ultrastructural data become available. Further lineages
could be present also in other regions of the tropical belt
(Reis, unpublished) and we assume that photobiont
diversity of tropical habitats is still underestimated.

None of the tropical isolations contained photobionts
of clade I, which was detected in *Ramalina farinacea* and
R. fraxinea of temperate regions. The photobiont of *R.*
fraxinea represents *Trebouxia arboricola*, while the

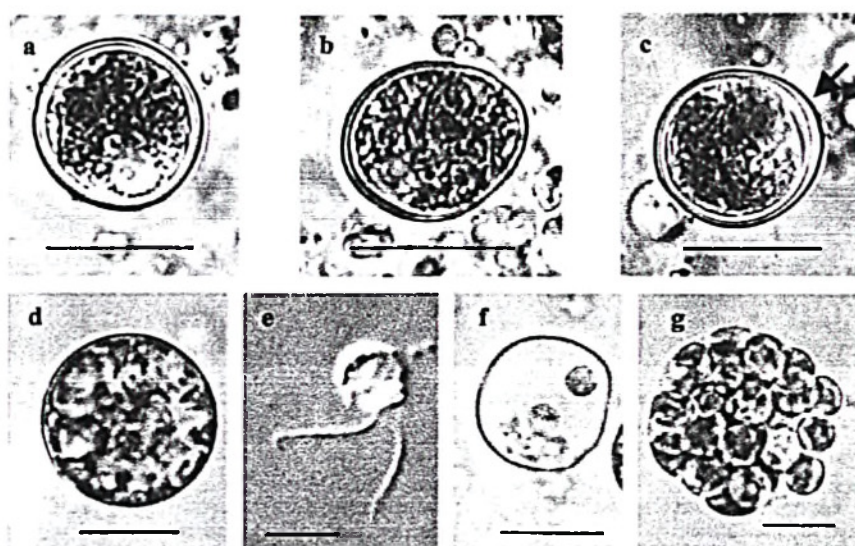


Fig. 5. Photobiont *Asterochloris* sp. isolated from *Cladina confusa*. (a, b) ellipsoidal vegetative cells showing structure of chloroplast. Nucleus and nucleolus visible. (c) developing zoosporangium with four chloroplasts and thickening of cell wall (arrow); (d) fully developed zoosporangium; (e) zoospore, showing two whip-like flagella and chloroplast in position posterior. Bar, 5 µm; (f) young zoospores within the old sporangial wall; (g) aplanosporangium. Bars, 10 µm. In (e) was used Normarski interference contrast.

photobiont of *R. farinaceae* belongs to a still unnamed clade with a photobiont of an Antarctic lichen (*Umbilicaria antarctica*) seems to be related to this lineage. In contrast, none of the tropical photobionts is found in a larger sample of temperate *Ramalina* species (Grube, unpublished data).

The classification of *Trebouxia* placed in the clade IV is somehow controversial. The species *T. higginsiae* and *T. galapagensis* were first described by Hildreth and Ahmadjian [42] (as *Pseudotrebourgia*). The descriptions are very similar: one of the important distinguishing characters was the presence of a discontinuous starch sheath in *T. higginsiae*. In 1989, Friedl [9] based on the pyrenoid structure, suggested that both are the same species together with *T. corticola*. Recently, Ettl and Gartner [39] kept the original interpretation of Hildreth and Ahmadjian [42], being the color of the colonies in the *Trebouxia*-agar the main difference in their key, i.e., light green in *T. galapagensis* and dark green in *T. higginsiae*.

Our molecular and morphological data suggest that the subclade IVa, that include the UTEX strains *T. galapagensis* and *T. higginsiae* and our isolated photobiont from *R. gracilis*, represents only one species. However, the cultivated photobiont from *R. complanata*, placed in subclade IVb may represent another species, beside its morphological similarities (chloroplast and pyrenoid) with *Trebouxia* from *R. gracilis* [39,42].

The presence of a predominantly tropical clade of photobionts is not conspicuous in the case of *Asterochloris* detected in *Cladonia*. While most of the tropical members have a photobiont belonging to the lineage c in our *Asterochloris* tree, this lineage is also found in non-tropical samples of *Cladonia* from the Southern United States. Clade c is well supported in our tree, however, the remainder of the *Asterochloris* phylogeny is not completely resolved. Therefore, to assess the infrageneric relationships equally well as in *Trebouxia* is not possible at present, since data from another locus for further analyses are not available.

However, our data result in an interesting question about the evolution of selectivity patterns in lichen symbionts. Usually, with certain exceptions, a rather strong pattern of selectivity is found in some foliose and fruticose species so far studied, e.g., *Flavoparmelia nivalis* and *Letharia vulpina*, respectively, accept only a subset of photobionts lineages in *Trebouxia simplex*, while *Xanthoria parietina* only associates with *Trebouxia arboricola*. While we notice a low selectivity in certain crustose species (e.g. *Lecanora rupicola*, Blaha et al., submitted), Schaper and Ott [43] has shown by in vitro experiments that symbiotic stages of the crustose *Fulgensia bracteata* are rapidly formed with their genuine photobionts, while formations of lichens association are clearly delayed in resynthesis experiments when other photobiont are used. However, the finding of different photobiont groups in tropical and temperate spe-

cies of the same mycobiont genus poses the question whether the phylogenetic diversification of *Ramalina* is accompanied by an evolution of increasing selectivity for photobionts, or if selectivity was equally strong also in the ancestors of *Ramalina* and the diversification of photobionts co-evolved with the host. Since both, temperate and tropical photobiont lineages are also present in a wide range of other mycobionts, a pattern of co-evolution is unlikely. Rather, the generally low photobiont selectivity so far found in crustose and squamulose lichen groups let us assume that photobiont selectivity was relaxed in the ancestors of *Ramalina*, which likely evolved from crustose groups of lichens [44]. The less conspicuous pattern with *Cladonia* photobionts could either be due to the low resolution of ITS sequences or to the fact that *Cladonia* contains both strictly fruticose species and groups with primary thalli of squamulose growth. It needs to be further studied, by more thorough sampling, whether photobiont selectivity are correlated with different growth forms in *Cladonia*.

Acknowledgments

This work was supported by doctoral fellowship from CAPES foundation (Brazil) to the first and second author. The authors wish to thank Dr. Marcello Pinto Marcelli (Botanical Institute, São Paulo, Brazil) and to Dr. Roman Türk (Institute of Plant Physiology, University of Salzburg, Austria) for identification of some of the lichen species, Dr. Sionara Elhasaro for discussion and Sociedade de Pesquisa em Vida Selvagem e Educação (SPVS) for possibility of the collects in the RPPN of Reserva Natural Salto do Itaquí-PR. ESW is very grateful to the Austrian Science Foundation (FWF) for generously supporting the cooperation between Brazil and Austria by the grant I5328-BIO, and MG acknowledges support by FWF grant.

References

- [1] Friedl, T. and Rokitta, C. (1997) Species relationships in the lichen alga *Trebouxia* (Chlorophyta, Trebouxiophyceae): molecular phylogenetic analyses of nuclear-encoded large subunit rRNA gene sequences. *Symbiosis* 23, 125–148.
- [2] Tschermak-Woess, E. (1989) Developmental studies in trebouxoid algae and taxonomical consequences. *Pl. Syst. Evol.* 164, 161–195.
- [3] Piercey-Normore, M.D. and DePrest, P.T. (2001) Algal switching among lichen symbioses. *Am. J. Bot.* 88, 1490–1498.
- [4] Tschermak-Woess, E. (1980) *Asterochloris phycobiontica*, nov. gen., nova spec., the phycobiont of the lichen *Varicellaria carneonivea* (Anzi) Ericks. *Pl. Syst. Evol.* 135, 279–294.
- [5] Beck, A., Kasalický, T. and Rambold, G. (2002) The mycobiont selection in a Mediterranean cryptogam community with *Fulgensia fulgida* and considerations on research strategies focussing on the selectivity of lichen bionts. *New Phytol.* 153, 317–326.

- [6] Romeike, J., Friedl, T., Helms, G. and Ott, S. (2002) Genetic diversity of algal and fungal partners in four species of *Umbilicaria* (Lichenized Ascomycetes) along a transect of the Antarctic peninsula. *Mol Biol Evol* 19, 1209–1217.
- [7] Helms, G. (2003) *Taxonomy and symbiosis in associations of Physciaceae and Trebouxia*. PhD thesis, Fakultät der Georg-August Universität Göttingen, Germany [Available on-line <http://webdoc.sub.gwdg.de/diss/2003/helms/>].
- [8] Dahlkild, A., Kallersjö, M., Lohlander, K. and Tehler, A. (2001) Photobiont diversity in *Physciaceae* (Lecanorales). *The Bryologist* 104, 527–536.
- [9] Friedl, T. (1989) *Systematik und Biologie von Trebouxia (Microthamniales, Chlorophyta) als Phycobiont der Parmeliaceae (lichenisierte Ascomyceten)*. Inaugural-Dissertation, Universität Bayreuth, Germany.
- [10] Beck, A., Friedl, T. and Rambold, G. (1998) Selectivity of photobiont choice in a defined lichen community: inferences from cultural and molecular studies. *New Phytol* 139, 709–720.
- [11] Rikkinen, J., Oksanen, I. and Lohlander, K. (2002) Lichen guilds share related cyanobacterial symbionts. *Science* 297 (5580), 357.
- [12] Thompson, R.H. and Wujek, D.E. (1997) *Trentepohliales: Cephaluros, Phycopeltis, and Stomatochroon*. Morphology, Taxonomy, and Ecology. Science Publishers, India.
- [13] Stocker-Wörgötter, E. (1997) Investigations on the photobiont and resynthesis of the tropical lichen *Coenogonium lepreurii* (Mont) Nvel from the NE coast of Brazil in Culture. *Symbiosis* 23, 117–124.
- [14] Friedl, T., Besendahl, A., Pfeiffer, P. and Bhattacharya, D. (2000) The distribution of Group I introns in lichen algae suggests that lichenization facilitates intron lateral transfer. *Mol. Phylog. Evol.* 14, 342–352.
- [15] Falkenberg, D.B. (1999) Aspects of the flora and secondary vegetation in the restinga from Santa Catarina State, South Brazil. *Insula* 28, 1–30.
- [16] Kashiwadani, H. and Kalb, K. (1993) The genus *Ramalina* in Brazil. *Lichenologist* 25, 1–31.
- [17] Ahti, T. and Marcelli, M. (1995) Taxonomy of the *Cladonia verticillaris* complex in South America. *Bibliotheca Lichenologica* 58, 207–213.
- [18] Ahti, T. (2000) *Cladoniaceae*. Flora Neotropica Monograph 78, 1–356.
- [19] Stocker-Wörgötter, E., Xavier-Filho, L. and Türk, R. (1994) Laboratory cultures of lichen fragments of two selected tropical Cladoniaceae (*Cladonia verticillaris*, *Cladonia substellata*) from the Northeast Coast of Brazil. *Cryptogamic Botany* 4, 309–313.
- [20] Stocker-Wörgötter, E. (1998) Culture methods and culture of selected mycobionts and photobionts as exemplified by South American lichens. In: *Lichenology in Latin America: History, Current Knowledge and Applications*, São Paulo (Marcelli, M.P. and Seaward, M.R.D., Eds.), pp. 143–155. Science Publishers, India.
- [21] Stocker-Wörgötter, E. (2001) Experimental studies of the lichen symbiosis: DNA-analyses, differentiation and secondary chemistry of selected mycobionts, artificial resynthesis of two and tripartite symbioses. *Symbiosis* 30, 207–227.
- [22] Walsh, G.E. (1974) Mangroves: a review. In: *Ecology of Halophytes* (Reinold, R.J. and Quenn, W.H., Eds.), pp. 51–174. Academic Press, New York.
- [23] Marcelli, M.P. (1992) *Ecologia Liquefica nos Manguezais do Sul Sudeste Brasileiro*. *Bibliotheca Lichenologica* 47, 1–310.
- [24] Cubero, O.F., Crespo, A., Fatehi, J. and Bridge, P.D. (1999) DNA extraction and PCR amplification method suitable for fresh, herbarium-stored, lichenized, and other fungi. *Pl. Syst. Evol.* 216, 243–249.
- [25] Kroken, S. and Taylor, J.W. (2000) Phylogenetic species, reproductive mode, and specificity of the green alga *Trebouxia* forming lichens with the fungal genus *Letharia*. *The Bryologist* 103, 645–660.
- [26] White, T.J., Bruns, T.D., Lee, S. and Taylor, J. (1990) Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal DNA genes for phylogenies. In: *PCR Protocols: A Guide to Methods and Applications* (Innis, M.A., Gelfand, D.H., Sninsky, J.J. and White, T.J., Eds.), pp. 322–345. Academic Press, San Diego.
- [27] Hall, T.A. (1999) BioEdit: a user friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT. *Nucl. Acids Symb. Ser.* 41, 95–98.
- [28] Huelsenbeck, J.P. and Ronquist, F. (2001) MrBayes: Bayesian inference of phylogenetic trees. *Bioinformatics* 17, 754–755.
- [29] Huelsenbeck, J.P. and Crandall, K.A. (1997) Phylogeny estimation and hypothesis testing using maximum likelihood. *Ann. Rev. Ecol. Syst.* 28, 437–466.
- [30] Nylander, J.A.A. (2002) MrModeltest v1.0b. Program distributed by the author. Department of Systematic Zoology, Uppsala University.
- [31] Swofford, D.L. (2000) *PAUP: Phylogenetic Analysis Using Parsimony*, V4.0b10. Smithsonian Institution, Washington, DC.
- [32] Page, R.D. (1996) TreeView: an application to display phylogenetic trees on personal computers. *Computational Applied Biosciences* 12, 357–358.
- [33] Yamamoto, Y., Mizuguchi, R. and Yamada, Y. (1985) Tissue cultures of *Usnea rubescens* and *Ramalina yasudae* and production of usnic acid in their cultures. *Agric. Biol. Chem.* 49, 3347–3348.
- [34] Bubrick, P. and Galun, M. (1986) Spore to spore resynthesis of *Xanthoria parietina*. *Lichenologist* 18, 47–49.
- [35] Stocker-Wörgötter, E. (2002) Laboratory cultures of selected lichen fungi from Brazil and Chile. *Mitteilungen aus dem Institut für Allgemeine Botanik in Hamburg* 30, 253–270.
- [36] Bischoff, H.W. and Bold, H.C. (1963) Some soil algae from enchanted rocks and related species. *University of Texas Publications* 6318. *Phycological Studies* 4, 1–95.
- [37] Beck, A. (2002) *Selektivität der Symbionten schwermetalltoleranter Flechten*. Dissertation, Ludwig Maximilians – Universität München.
- [38] Helms, G., Friedl, T., Rambold, G. and Mayrhofer, H. (2001) Identification of photobionts from the lichen family *Physciaceae* using algal-specific ITS rDNA sequencing. *Lichenologist* 33, 73–86.
- [39] Ettl, H. and Gärtner, G. (1995) *Syllabus Der Boden-, Luft- Und Flechtenalgen*. Gustav Fischer, Verlag Stuttgart.
- [40] Yahr, R., Vilgalys, R. and DePriest, P.T. (2004) Strong fungal specificity and selectivity for algal symbionts in Florida scrub *Cladonia* lichens. *Mol. Ecol.* 13, 3367–3378.
- [41] Brodo, I.M., Sharnoff, S.D. and Sharnoff, S. (2001) *Lichens of North America*. Yale University, New Haven, CT.
- [42] Hildreth, K.C. and Ahmadjian, V. (1981) A study of *Trebouxia* and *Pseudotrebouxia* isolates from different lichens. *Lichenologist* 13, 65–86.
- [43] Schaper, T. and Ott, S. (2003) Photobiont selectivity and interspecific interactions in lichen communities: Culture experiments with the mycobiont *Fulgensia bracteata*. *Plant Biology* 5, 441–450.
- [44] Ekman, S. (2001) Molecular phylogeny of the bacidiaceae (Lecanorales, lichenized Ascomycota). *Mycol. Res.* 105, 782–797.
- [45] Bhattacharya, D., Friedl, T. and Damberger, S. (1996) Nuclear-encoded rDNA group I introns: origin and phylogenetic relationships of insertion site lineages in the green algae. *Molec. Biol. Evol.* 13, 978–989.
- [46] Helms, G.W., Hauck, M., and Friedl, T. (2002) Photobiont selectivity in the epiphytic lichen *Hypogymnia physodes* and *Lecanora comacoides*. Unpublished.